



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Reproduktionsstörande ftalater i hundleksaker på den svenska marknaden

Sandra Nohrborg

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:15*

Reproduktionsstörande ftalater i hundleksaker på den svenska marknaden

Phthalates in Dog Toys on the Swedish market

Sandra Nohrborg

Handledare: Sara Persson, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Ulf Magnusson, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Eva Axné, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:15

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Ftalater, hundleksaker, reproduktionstoxicitet, reproduktion, antiandrogena substanser, endokrinstörande ämnen

Key words: Phthalates, dog toys, reproductive toxicity, reproduction, anti-androgenic substances, endocrine disruptors

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Ftalater är benämningen på en grupp kemikalier som används som mjukgörare i olika material. Ett av de vanligaste användningsområdena är som mjukgörare i polyvinylplast (PVC) vilket är ett material som används till många produkter, till exempel leksaker. Ftalater klassas som "externa mjukgörare" vilket innebär att de har en tendens att läcka från produkter i vilka de ingår. Människor och djur kan sedan ta upp ftalater peroralt, via inhalation, transkutant eller exponeras *in utero*. Ett flertal ftalater har visat sig vara hormonstörande och orsaka reproduktionstoxiska effekter varför en lagstiftning har införts på EU-nivå för att begränsa användningen av vissa ftalater i leksaker till barn och barnavårdsartiklar. När det gäller leksaker till sällskapsdjur finns dock ingen sådan lagstiftning. De reproduktionstoxiska effekter som setts hos djur som gnagare och kanin är bland annat kryptorkidism, testikelneoplasi, små och atrofierade testiklar och bitestiklar samt små accessoriska könskörtlar. Även försämrad spermakvalitet och nedsatt fertilitet har observerats. De toxiska effekterna tros uppkomma till följd av en antiandrogen effekt hos ftalater och det verkar som att foster och unga djur är mest känsliga. När det gäller hund har endast ett fåtal studier gjorts avseende ftalaters toxicitet men det finns studier som indikerar att det är troligt att även hundar kan drabbas. Detta i kombination med att kryptorkidism och testikelneoplasi är två tillstånd som förekommer hos hund gör att det är relevant att utreda hur exponeringen för ftalater ser ut hos detta djurslag. Därför utfördes en pilotstudie i syfte att undersöka halterna av ett antal olika ftalater i hundleksaker på den svenska marknaden. Tio leksaker av olika material valdes ut för analys och resultatet visade att två av leksakerna innehöll ftalathalter som översteg de gränsvärden som finns uppsatta när det gäller barnleksaker. För att utreda hur stor risk det är för hundar att använda leksaker med dessa halter av ftalater behövs fler studier avseende toxicitet och total exponering på detta djurslag. Ur försiktighetssynpunkt blir slutsatsen ändå, baserat på att det inte går att utesluta en effekt, att rekommendationer kan ges om att i möjligaste mån välja leksaker av andra material än PVC, speciellt till dräktiga tikar och valpar, samt att barn inte bör leka med hundleksaker.

SUMMARY

Phthalates are a group of chemicals used as plasticizers in different materials. One of the most common areas of use is as plasticizers for polyvinyl chloride (PVC) which is used in many products, for example toys. Phthalates are classified as "external plasticizers" which means that they have a tendency to leach into the environment. The phthalates then enter the body perorally, through inhalation, transcutaneously or through the placenta *in utero*. Several phthalates have been shown to be endocrine disruptors and to have toxic effects on the reproductive system. Therefore, legislation has been adopted by the European Union to limit the use of certain phthalates in children's articles and toys. Such legislation does not exist regarding toys made for companion animals. Some of the effects on the male reproductive system in animals such as rodents and rabbits are cryptorchidism, testicular neoplasia, small and atrophied testicles and epididymides and small accessory glands. Also, reduced sperm quality and fertility has been observed. These effects are induced by the anti-androgenic action of the phthalates and it seems that fetuses and young animals are most sensitive. There are only a few studies conducted on dogs regarding the toxicity of phthalates, but the existing studies indicate that dogs are susceptible to the anti-androgenic effects as well. This, in combination with the fact that both cryptorchidism and testicular neoplasia occur in dogs, makes it relevant to study the exposure of phthalates to dogs. A pilot study has therefore been conducted with the purpose to investigate the concentrations of different phthalates in dog toys on the Swedish market. Ten toys of different materials were chosen for analysis and the results showed that two of them contained phthalate

concentrations greater than the limit values for children's articles and toys that has been imposed by the European Union. In order to evaluate the health risks related to the use of dog toys that contains phthalates, more studies are needed regarding toxicity and total exposure to phthalates in this species. However, as dogs seem to be susceptible and elevated concentrations of phthalates were found in dog toys in this study, it is relevant to recommend dog owners to choose dog toys made of other materials than PVC, especially for pregnant bitches and puppies. In addition, dog toys should not be used as toys for children.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	3
Ftalater och deras användningsområden	3
Regelverk	4
Toxiska effekter.....	5
<i>Allmänt</i>	5
<i>Reproduktion</i>	6
<i>Övrigt</i>	12
Exponering och risk.....	13
PILOTSTUDIE	16
Introduktion.....	16
Material och metoder.....	18
Resultat.....	18
<i>Leksakstyper</i>	18
<i>Förekomst av ftalater</i>	20
Diskussion	22
REFERENSER.....	26
BILAGA 1	

INLEDNING

Ftalater är en stor grupp kemikalier som har ett flertal användningsområden. Ett av de största är användningen som mjukgörare i produkter som består helt eller delvis av polyvinylplast (PVC) (Kavlock *et al.*, 2006; Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008; KemI, 2014). Exempel på sådana produkter är leksaker till både barn och djur, olika typer av förpackningar och vinylgolv. Ftalaterna avges lätt från de produkter i vilka de ingår vilket i kombination med en omfattande användning av ftalater i industrin gör att de förekommer utbrett i vår omgivning (Heudorf *et al.*, 2007). Detta gör i sin tur att både människor och sällskapsdjur riskerar att exponeras för ftalater dagligen utan att vara medvetna om det. Ftalater tas upp av kroppen peroralt, transkutant, via inhalation och via placenta *in utero* (Heudorf *et al.*, 2007). När det gäller oralt intag har försök visat att ftalatinnehållande föremål som tuggas på (till exempel leksaker) frisätter större mängd ftalater till saliven än om de inte tuggas på (Steiner *et al.*, 1998; Wooten & Smith, 2013).

Det är sedan länge känt att vissa ftalater kan ha en reproduktionstoxisk effekt hos flera djurarter vilken har kunnat kopplas till en endokrinstörande verkningsmekanism (Gray & Gangolli, 1986; Gray *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2003; Lee & Veeramachaneni, 2005; Moody *et al.*, 2013). Toxiciteten yttrar sig exempelvis genom missbildningar och förändringar av de hanliga könsorganen så som kryptorkidism samt atrofi och aplasi av testiklarna, bitestiklarna och de accessoriska könskörtlarna (Gray *et al.*, 2000; Barlow & Foster, 2003; Lee & Veeramachaneni, 2005; Moody *et al.*, 2013). Även försämrad spermakvalitet och ökad risk för utveckling av vissa testikelneoplasier har kunnat kopplas till ftalatexponering (Arcadi *et al.*, 1998; Mylchreest *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 2003). Mottagligheten för ftalaternas toxicitet är som störst under utvecklingen av reproduktionsorganen vilket innebär att foster och unga djur är känsligast (Gray & Gangolli 1986; Sjöberg *et al.*, 1986).

På grund av ftalaternas oönskade effekter har en särskild lagstiftning införts på EU-nivå genom Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG¹. Denna förordning förbjuder användningen av ett flertal ftalater i barnleksaker och barnvårdsprodukter. Däremot finns ingen sådan lagstiftning när det gäller hundleksaker trots att dessa är producerade och marknadsförda i syfte att tuggas på. Det är möjligt att hundar är exponerade i hög grad eftersom de ibland använder tuggleksaker av till exempel plast under hela sin livstid och vistas i stor grad på golvet inomhus där både golvet i sig och hushållsdamm innehåller och släpper ifrån sig ftalater (Heudorf *et al.*, 2007). I sammanhanget är det intressant att testikelneoplasier och kryptorkidism förekommer relativt frekvent hos hund (Hayes *et al.*, 1985; Grieco *et al.*, 2008a) vilket är två åkommor som i studier på andra djurslag visat sig ha en möjlig koppling till ftalatexponering (Imajima *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2000).

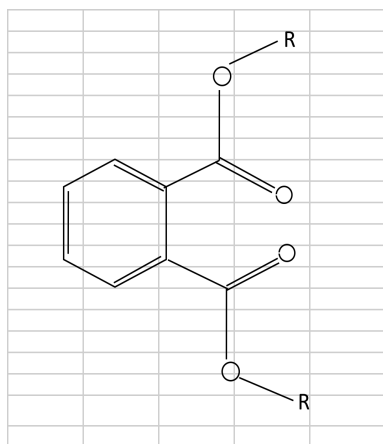
¹) EUT L 396, 30.12.2006, s. 1-849, Celex 32006R1907.

Syftet med detta examensarbete var därför att genomföra en fördjupande litteraturstudie på området samt att utföra en pilotstudie för att undersöka nivåerna av ett antal olika ftalater i hundleksaker på den svenska marknaden idag.

LITTERATURÖVERSIKT

Ftalater och deras användningsområden

Ftalater är en vanlig benämning på en stor grupp kemikalier som utgörs av diestrar av ortoftalsyra (1,2-benzendikarboxylsyra) (Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008; Miljøstyrelsen, 2010; KemI, 2014). De har en gemensam grundstruktur (se figur 1) och skiljer sig mellan varandra via sina sidokedjor som kan variera i längd och utformning (Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008; Miljøstyrelsen, 2013). Det är också sidokedjorna som ger de olika ftalaterna sina individuella egenskaper, både fysiska och kemiska (Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008), vilket kan resultera i exempelvis skillnader i reproduktionstoxisk effekt. I två olika studier har man sett att de ftalater som har fyra till sex kolatomer i sin kolkedja och som har så kallad orthostruktur hämmar testosteronproduktionen och orsakar störningar i utvecklingen av könsorganen hos hanliga foster, till skillnad från övriga ftalater som testades (Gray *et al.*, 2000; Howdeshell *et al.*, 2008). Exempel på ftalater med sådan struktur och som ger upphov till sådana reproduktionstoxiska effekter, utifrån dessa två studier, är benzylbutylftalat (BBP), dibutylftalat (DBP), di(2-etylhexyl)ftalat (DEHP), diisobutylftalat (DIBP) och dipentylftalat (DPP).



Figur 1. Grundstruktur av en orthoftalat där *R* representerar olika typer av sidokedjor som t.ex. linjära alkylkedjor. Det är sidokedjorna som ger ftalaterna deras individuella egenskaper.

Ftalaterna klassas som så kallade ”externa mjukgörare” vilket innebär att de inte är kemiskt bundna till den produkt de ingår i och har således en tendens att läcka till miljön, material och individer i kontakt med produkten i fråga (Petersen & Breindahl, 2000; Heudorf *et al.*, 2007; Miljøstyrelsen, 2010; KemI, 2014). En individ får i sig ftalater genom direkt kontakt med produkter som innehåller dessa eller indirekt via omgivningen (Heudorf *et al.*, 2007). Då ftalater är mycket vanligt förekommande finns de generellt i vår omgivning vilket leder till ett konstant upptag. Ftalaterna tas upp av kroppen peroralt, transkutant, via inhalation eller via placenta *in utero* (Stroheker *et al.*, 2006; Heudorf *et al.*, 2007). Hos människa tros den vanligaste exponeringsvägen vara peroralt via kontaminerad föda (Kavlock *et al.*, 2006). Vad gäller överföring av ftalater via placenta kan sägas att placentan reducerar nivån som överförs jämfört med moderdjurets nivå men den hindrar inte en överföring vilket således möjliggör en påverkan på fostret (Stroheker *et al.*, 2006).

Användningsområdena för ftalater är många men de är framförallt kända för den omfattande användningen som mjukgörare i produkter som består av polyvinylplast (PVC) (Kavlock *et al.*, 2006; Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008; KemI, 2014). De kan även förekomma i andra produkter som till exempel gummiprodukter, färg, ammunition, kosmetika och lim. Att ftalater används i så stor utsträckning beror till stor del på att de är effektiva och relativt billiga (Miljöstyrelsen, 2010). Den mest använda ftalaten i EU har tidigare varit DEHP men användningen hos producenter på marknaden har minskat, troligen på grund av att den har visat sig ha reproduktionstoxiska effekter (Stringer *et al.*, 2000; KemI, 2014). I andra delar av världen används den dock fortfarande frekvent (KemI, 2014). Två andra ftalater som är några av de vanligaste är diisononylftalat (DINP) och diisodecylftalat (DIDP) (NTP-CERHR, 2003; Heudorf *et al.*, 2007; Miljöstyrelsen, 2010).

Regelverk

Halterna av ftalater i varor på den svenska marknaden kontrolleras framförallt genom en gemensam EU-lagstiftning som grundar sig på försiktighetsprincipen. Förordning (EG) nr 1907/2006, i dagligt tal kallad Reach-förordningen, förmedlar det mesta av gällande lagstiftning på området. Något förbud mot användning av ftalater i produkter generellt finns inte än men kommer att införas för ett antal ftalater i februari 2015. Detta kommer att innebära att ftalaterna DEHP, DBP, BBP och DIBP blir uppsatta på den så kallade tillståndsförteckningen där användning av kemikalien förbjuds om inte ett särskilt tillstånd finns enligt förordning (EG) nr 1907/2006, bilaga XIV. Det som dock bör påpekas är att denna lagstiftning inte omfattar varor som importeras från ett icke EU-land vilket leder till en fortsatt exponering trots detta förbud.

Utöver tillståndsförteckningen har EU:s kemikaliemyndighet (ECHA) upprättat en lista på kemikalier som kallas kandidatförteckningen (ECHA, 2014). Denna lista innehåller ämnen som ”inger särskilt stora betänkligheter” när det gäller till exempel hälsoeffekter hos människa. Dessa ämnen är föremål för utvärdering huruvida de ska hamna på tillståndsförteckningen eller inte. Kandidatförteckningen omfattar idag tolv olika ftalater vilket innebär särskilda begränsningar när det gäller användandet av dessa. Exempel på sådana begränsningar är att tillverkare eller importörer måste anmäla användandet av ftalater på kandidatförteckningen till ECHA om produkten/produkterna innehåller mer än 0.1% av någon av dessa samt om den totala mängden använd ftalat för denna tillverkare eller importör överstiger 1 ton per år enligt förordning (EG) nr 1907/2006. Att importörerna också inkluderas i dessa bestämmelser gör att även importerade varor omfattas. Om ett ämne finns på kandidatförteckningen har också konsumenten, vid efterfrågan, rätt till information inom 45 dagar om innehåll av ett sådant ämne i produkter om halten överstiger 0.1%.

Vidare finns, utöver de generella reglerna när det gäller ftalater i varor, särskilda bestämmelser när det gäller ftalatinnehåll i leksaker till barn och barnavårdsartiklar i bilaga XVII till förordning (EG) nr 1907/2006. Här framgår att DEHP, DBP och BBP inte får användas i leksaker och barnavårdsartiklar om koncentrationen överstiger 0.1% av totalvikten av det mjukgjorda materialet. Vidare får inte ftalaterna DINP, DIDP och di(n-oktyl)ftalat (DNOP) användas i koncentrationer överstigande 0.1% av totalvikten av det mjukgjorda materialet om leksaken eller barnavårdsprodukten kan stoppas i munnen. När det gäller övriga ftalater i kandidatförteckningen får de inte finnas i halter som överstiger 0.3% av

viktvolymen i tillgängliga delar leksaker för barn upp till 14 år då de är klassade som reproduktionstoxiska enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG² och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 och Europaparlamentets och rådets direktiv 2009/48/EG av den 18 juni 2009 om leksakers säkerhet³. Ovanstående gränsvärden gäller alla produkter i dessa kategorier som släpps ut på EU-marknaden vilket innebär att de även omfattar importerade produkter.

När det gäller märkning finns det tydliga regler kring detta när det gäller barnleksaker vilka tas upp i direktiv 2009/48/EG. Bland annat ska leksaker till barn ha tydlig information som möjliggör spårning av ursprung och tillverkare. I övrigt ska alla leksaker för barn som tillhandahålls på EU-marknaden vara CE-märkta vilket är en garanti för att produkten uppfyller gällande lagstiftning på området.

Någon lagstiftning gällande ftalatinnehåll i hundleksaker finns inte bortsett från de generella regler angående ftalater som är nämnda ovan.

Toxiska effekter

De toxiska effekter som setts efter exponering för ftalater gäller framförallt reproduktionsorganen där både makro- och mikroskopiska förändringar och missbildningar observerats hos både han- och hondjur hos flera djurslag (Gray & Gangolli, 1986; Jones *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994a; Imajima *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2000; Mylchreest *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000; Anas *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2003; Lee & Veeramachaneni, 2005; Ljungvall *et al.*, 2005; Moody *et al.*, 2013). Andra toxiska effekter som iakttagits är till exempel påverkan på lever och njurar samt en generell toxisk påverkan i form av viktnedgång (Agarwal *et al.*, 1986; Arcadi *et al.*, 1998; David *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2002; Moody *et al.*, 2013). Den följande litteratursammanfattningen kommer dock främst att utgå från de toxiska effekterna på reproduktionsorganen.

Allmänt

När det gäller utredning av ftalaternas toxiska verkan har majoriteten av studierna på området gjorts på rått. Det finns även studier på andra djurslag som till exempel mus, människa, apa, groda och kanin. På hund verkar dock antalet studier mycket begränsat vid sökning av publicerade studier via de vanligaste sökmotorerna så som PubMed.

Efter oralt intag av ftalater hydrolyseras det mesta av dem av enzymet lipas i framför allt tunntarmen från att vara en diester till en monoester och tas upp av kroppen (ATSDR, 2002; Ljungvall *et al.*, 2004). Utifrån den absorberade metaboliten bildas sedan ett stort antal ytterligare metaboliter via

²) EUT L 353, 31.12.2008, s. 1-1355, Celex 32008R1272.

³) EUT L 170, 30.6.2009, s. 1-37, Celex 32009L0048.

oxidativa processer (Albro, 1986; ATSDR, 2002). Hur metabolismen sker varierar mellan olika djurslag, till exempel när det gäller hur stor andel av den intagna mängden ftalater som absorberas, vilka metaboliter som bildas och hur metaboliterna utsöndras (Ikeda *et al.*, 1980; Kessler *et al.*, 2004; Ljungvall *et al.*, 2004).

Ett stort antal studier har genomförts där man jämfört just metabolismen av ftalater mellan olika djurslag och stora skillnader har visats (Ito *et al.*, 2005; Kurata *et al.*, 2012). Ito *et al.* (2005) har visat att aktiviteten hos lipas varierar kraftigt mellan djurslagen mus, råtta och silkesapa efter exponering för DEHP. Möss hade i denna studie en lipasaktivitet i flertalet organ som var flera hundra gånger större än vad den var hos silkesapor som hade den lägsta lipasaktiviteten (Ito *et al.*, 2005). Detta är intressant då det är just ftalaternas metaboliter som anses utöva den toxiska verkan på kroppens celler (Albro, 1986; Davis *et al.*, 1994b; Chauvigné *et al.*, 2009). Absorptionen av ftalater och deras metaboliter verkar också skilja sig åt, troligen delvis på grund av skillnad i just lipasaktiviteten. Till exempel verkar gris absorbera DEHP och dess metaboliter i lägre grad än vad som setts hos råtta och den systemiska exponeringen blir således också mindre (Ljungvall *et al.*, 2004). Det har också i en annan studie visats att samma dos DEHP ger upphov till signifikant lägre nivåer av den aktiva metaboliten mono(2-etylhexyl)ftalat (MEHP) i blodet hos silkesapa jämfört med hos råtta (Kessler *et al.*, 2004). Detta har betydelse för hur stor toxisk verkan en ftalat har på ett visst djurslag.

Som nämnts ovan så skiljer sig även metabolismen på det sätt att ftalaterna tas om hand och utsöndras på olika sätt beroende på djurslag. På hund har man i en studie visat att majoriteten av metaboliterna av DEHP utsöndras via faeces (Ikeda *et al.*, 1980). På gris däremot visade man i samma studie att metaboliterna till minst del utsöndras via faeces och att majoriteten istället utsöndrades via urin. I studien inkluderades även råtta som också, precis som hund, utsöndrade majoriteten av metaboliterna i faeces fast i mindre omfattning. Utöver detta såg man också att ett flertal av metaboliterna som bildades var samma hos råtta och hund vilket indikerar att dessa två djurslags metabolism av DEHP liknar varandra. Trots vissa likheter är det med tanke på skillnaderna i metabolism mellan olika arter inte helt enkelt att göra djurslagsövergripande jämförelser när det gäller ftalaternas effekter.

Reproduktion

Ftalaternas reproduktionstoxiska effekter varierar mycket mellan olika ftalater. Exempelvis har DINP och DEHP, som båda orsakar reproduktionstoxiska effekter, tydligt olika potens där DINP anses vara tio till 20 gånger mindre potent än DEHP (Gray *et al.*, 2000). Som nämnts ovan är det ftalatens kemiska struktur som bestämmer dess egenskaper. Ett exempel på detta är att ftalaten dioktyltereftalat (DOTP), en isomer till DEHP, inte framkallar reproduktionstoxiska effekter medan DEHP orsakar ett flertal sådana (Gray *et al.*, 2000). Det är därför svårt att återge en samlad bild av ftalaternas toxiska verkan. DEHP är den ftalat vars effekter studerats mest och mycket av nedanstående sammanfattning utgår därför från forskningen kring denna.

Ftalaternas toxiska effekter har funnits vara kopplad till en endokrinstörande verkningsmekanism (Davis *et al.*, 1994b; Mylchreest *et al.*, 2000). Reproduktionstoxiska effekter har setts hos både han- och hondjur men de flesta studier på området har fokuserat på effekterna hos handjur (Davis *et al.*, 1994a, 1994b; Mylchreest *et al.*, 2000; Howdeshell *et al.*, 2008).

Hanliga könsorgan

Endokrinologi

Den normala utvecklingen av de hanliga könsorganen är mycket beroende av hormoner (t.ex. anti-mülleriskt hormon, testosteron och insulinlik faktor-3) under fostertiden och en störning av produktionen av dessa hormoner leder till att utvecklingen av könsorganen påverkas (Gray *et al.*, 2000; Sharpe, 2006). Det verkar som att den endokrinstörande effekten framförallt utövas av ftalaternas metaboliter. Exempelvis har man sett både *in vivo* och *in vitro* att metaboliter till DEHP, så som MEHP, kan ha en antiandrogen verkan hos hanråtta (Stroheker *et al.*, 2005; Chauvigné *et al.*, 2009).

I en studie utförd av Chauvigné *et al.* (2009) visar man *in vitro* att MEHP hämmar testosteronproduktionen i fetala råttestiklar (Chauvigné *et al.*, 2009). Dock verkar sänkningen av testosteronproduktionen inte vara kopplad till en minskad förmåga att svara på luteiniseringshormon (LH) hos Leydigcellerna då denna förmåga var oförändrad vid exponering för MEHP. Samma studie visade även att DEHP, till skillnad från dess metabolit, kan ge upphov till ökad testosteronproduktion. En annan *in vitro*-studie har visat på en hämning av testosteronsekretionen i hundtestiklar efter exponering för MEHP och MBP (Pathirana *et al.*, 2011). Ett flertal *in vivo*-studier har också gjorts. Ett exempel är en studie på råttor som visat att exponering av dräktiga honor för DEHP leder till en sänkt testosteronproduktion hos hanliga foster ner till honliga nivåer under den tid av dräktigheten då reproduktionsorganen utvecklas (Parks *et al.*, 2000). Motsvarande fynd har gjorts för ftalaten DBP, där man har sett att hanråttor enbart exponerade *in utero* får en kraftigt sänkt testosteronproduktion under fostertiden (Fisher *et al.*, 2003). Denna sänkning var dock inte bestående postnalt då exponeringen var avbruten.

Den toxiska påverkan på testosteronproduktionen verkar dock variera beroende på djurets ålder och när djuret först exponeras (Akingbemi *et al.*, 2001). En *in vivo*-studie på prepubertala hangrisar har istället för en minskad testosteronproduktion visat på en ökad sådan efter parenteral administrering av DEHP under fem veckor med start efter avvänjning (Ljungvall *et al.*, 2005). Utöver detta sågs även större och fler Leydigceller än normalt histologiskt. Motsvarande scenario har iakttagits hos hanråtta (Akingbemi *et al.*, 2001). I denna studie sågs, precis som ovan (Parks *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003), en sänkt testosteronproduktion hos hanråttor utsatta för DEHP *in utero* och under digivningsperioden. Sänkt testosteronproduktion observerades, i denna studie, även hos prepubertala hanråttor som efter avvänjning exponerades för DEHP under 14 dagar. Däremot fick prepubertala råttor som exponerades dubbelt så lång tid (28 dagar) istället en ökad produktion av både testosteron och LH. Exakt vad som orsakar den ökade testosteronproduktionen är inte helt klarlagt men författarna tror att det har att göra med det feedbacksystem som reglerar testosteronproduktionen i Leydigcellerna. I samma studie utsattes även vuxna hanråttor som för DEHP men hos dessa sågs ingen påverkan på testosteronproduktionen.

Det är inte bara testosteronproduktionen som påverkas av ftalater. Även produktionen av hormonet insulinlik faktor-3, som också produceras av Leydigcellerna, kan hämmas vid ftalatexponering hos till exempel råtta och hund (Wilson *et al.*, 2004; McKinnell *et al.*, 2005; Arrighi *et al.*, 2010; Pathirana *et*

al., 2011). Insulinlik faktor-3 är bland annat involverat i den första delen av testiklarnas nedvandring under fostertiden (Zimmermann *et al.*, 1999; Emmen *et al.*, 2000).

Toxiska effekter på reproduktionsorganen

Ftalater kan på grund av sin negativa effekt på testosteronproduktionen ge upphov till missbildningar och underutveckling av androgenberoende vävnader så som de yttre könsorganen och de accessoriska könskörtlarna (Gray *et al.*, 2000). DEHP har bland annat visats ge upphov till testikelatrofi hos hanrätta på ett dos- och åldersberoende sätt (Gray & Gangolli, 1986; Sjöberg *et al.*, 1986). Med detta menas att man sett att höga doser DEHP ger upphov till allvarligare förändringar än låga doser och att äldre individer inte utvecklar förändringar i lika hög grad som yngre. Signifikant mindre testiklar har också påvisats hos neonatala hanrättor som blivit exponerade för till exempel DEHP *in utero* efter oralt intag av DEHP av moderdjuret (Parks *et al.*, 2000). Små, atrofierade eller vätskefyllda testiklar ibland i kombination med avsaknad av spermier har även setts hos hanrätta efter exponering *in utero* för DINP, DEHP och BBP (Gray *et al.*, 2000). Studier har också visat på signifikant mindre bitestiklar hos neonatala hanrättor utsatta för DBP, BBP och DEHP *in utero* (Gray *et al.*, 2000; Barlow & Foster, 2003). Exempel på en annan effekt som setts på de hanliga könsorganen är minskad storlek av de accessoriska könskörtlarna hos hanrätta vid exponering för till exempel DEHP och BBP och hos hankanin vid exponering för DBP (Agarwal *et al.*, 1986; Gray *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2003).

Handjur som utsatts för DBP, BBP och DEHP *in utero* har också visat tecken på feminisering som till exempel kvarvarande spenar och minskat anogenitalt avstånd (Gray *et al.*, 2000; Mylchreest *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Det anogenitala avståndet hos handjur är normalt längre än hos hondjur då utvecklingen av detta är en androgenstyrd process (Moore *et al.*, 2001). Ftalaternas antiandrogena verkan orsakar följaktligen ett förkortat anogenitalt avstånd hos handjur. Vad gäller spenar hos rätta kan sägas att hondjur normalt har tolv spenar medan handjur normalt inte har några alls (Gray *et al.*, 2000). I en studie av Gray *et al.* (2000) där hanrättor utsattes för olika ftalater *in utero* sågs att de flesta individer exponerade för DEHP och BBP hade kvarvarande spenar (mellan 1-14 stycken) (Gray *et al.*, 2000). En stark korrelation har också visats mellan förkortat anogenitalt avstånd och kvarvarande spenar hos hanrättor efter exponering för DBP *in utero* (Mylchreest *et al.*, 2000). I studien som visade detta var också kvarvarande spenar den känsligaste markören för störningar i den hanliga könsutvecklingen. Förutom ovan nämnda förändringar/missbildningar har även kryptorkidism visat sig vara en möjlig följd av exponering för ftalater *in utero* för rätta och kanin (Imajima *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2000; Barlow & Foster 2003; Fisher *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2003). Detta ämne kommer att tas upp mer i detalj senare i detta avsnitt.

I råtttestiklar har man på cellnivå sett en toxisk verkan av ett flertal ftalater på både Sertoliceller och Leydigceller med en sekundär sänkning av testosteronproduktionen som följd (Gray & Gangolli, 1986; Jones *et al.*, 1993). Graden av denna påverkan varierar dock mellan olika ftalater (Jones *et al.*, 1993). En studie som försökt utreda den toxiska effekten av MEHP på neonatala hanrättor visar att MEHP har en direkt toxisk verkan på Sertolicellerna (Li *et al.*, 1998). Ett annat *in vitro*-försök på fetala råtttestiklar har visat att MEHP minskar gonocytantalet, ökar takten av apoptos av gonocyter och försämrar Sertolicellernas funktion (Chauvigné *et al.*, 2009). Huruvida DEHP och dess metaboliter agerar direkt på Leydigcellerna eller indirekt via störning av parakrina faktorer från Sertolicellerna tycks inte vara helt klarlagt. Det verkar dock som att man är överens om att den antiandrogena

effekten av DEHP kommer från en direkt effekt på cellerna i testiklarna och inte genom att verka som en androgenreceptorantagonist (d.v.s. DEHP blockerar inte androgenreceptorn) (Mylchreest *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003). När det gäller DBP har en studie visat att exponering av hanrättor *in utero* ger upphov till störd utveckling av Sertoliceller, Leydigcellhyperplasi och onormala gonocyter under fostertiden (Fisher *et al.*, 2003).

I en studie där man tittat på råtttestiklar histologiskt efter perinatal DEHP-exponering har man även visat på avsaknad av spermatocyter, avlossning av spermatogonier från basalmembranet, onormala spermatider samt en generellt onormal struktur av testikelvävnaden (Arcadi *et al.*, 1998). DEHP har även i andra studier, vid högre doser, visat sig kunna påverka spermie kvaliteten negativt med till exempel sänkt motilitet och onormal spermiestruktur (Agarwal *et al.*, 1986). Om detta påverkar den hanliga förmågan att befrukta och åstadkomma livsdugliga foster verkar dock inte säkert. Agarwal *et al.* (1986) visade till exempel att dräktighetsprocent, födelsevikt hos ungarna, antal dödfödda/neonatalt döda och tidig tillväxt hos ungarna inte påverkades negativt om den befruktande hanrättan exponerats för DEHP. Något som däremot talar för att den hanliga fertiliteten påverkades är att man såg mindre kullstorlekar då hanrättan varit DEHP-exponerad jämfört med kullar efter kontrollrättor (Agarwal *et al.*, 1986). Ferrara *et al.* (2006) hävdar i sin tur att ftalater mycket väl kan påverka fertiliteten hos handjur (Ferrara *et al.*, 2006). De utförde en studie på råttor där man såg att efter exponering för DBP *in utero* stördes gonocytutvecklingen hos hanliga foster vilket sedan återspeglades i en fortsatt onormal utveckling och aktivering av gonocyterna postnatalt och under den tidiga puberteten. Detta i sin tur föreslås kunna leda till nedsatt fertilitet i vuxen ålder. Ytterligare en studie där rättor utsatts för DBP *in utero* stärker teorin om en negativ påverkan på fertiliteten (Fisher *et al.*, 2003). I denna studie lyckades enbart två av tio hanrättor som exponerats *in utero* befrukta honrättor jämfört med nio av tio kontrollrättor. Vad gäller spermakvaliteten har det även setts att denna påverkas negativt hos hankanin som exponeras för DBP *in utero* och prepubertalt (Higuchi *et al.*, 2003).

De histologiska förändringarna i testiklarna verkar dock inte gälla alla djurarter. I en studie där man undersökte silkesapors testiklar histologiskt efter exponering för DEHP i olika doser från avvänjning till sexuell mognad sågs inga onormala fynd kopplade till exponering på varken Leydigceller, Sertoliceller eller spermatogenetiska celler (Tomonari *et al.*, 2006). I denna studie sågs inte heller någon sänkning i serumtestosteron. Fynden i den här studien indikerar att primater inte är lika känsliga för de toxiska effekter DEHP kan ha på reproduktionssystemet hos handjur. Dock är antalet studier begränsade när det gäller exponering för ftalater av primater *in utero* varför vissa författare hävdar att det inte går att uttala sig om ftalaternas eventuella reproduktionstoxiska effekter på denna typ av djur (Gray *et al.*, 2000). Motsvarande scenario har setts på galtar som utsatts för DEHP prepubertalt efter tre veckors ålder men inte *in utero* eller under digivning (Ljungvall *et al.*, 2008). Grisarna delades upp i två grupper och histologisk undersökning av testiklarna gjordes efter avlivning vid sju veckor respektive nio månaders ålder. Inga histologiska avvikelser jämfört med kontrollgruppen kunde då påvisas i någon av åldersgrupperna. Dock bör nämnas att doserna i denna studie var lägre än de doser som framkallat histologiska lesioner hos till exempel råttor.

Det har även setts en påverkan på det sexuella beteendet hos sexuellt mogna hanrättor som utsatts för DEHP *in utero* (Moore *et al.*, 2001). De hanrättor som utsattes för de högsta doserna DEHP besteg honrättorna i en signifikant lägre utsträckning, varav inte någon av hanrättorna i gruppen som utsatts för den högsta dosen.

Kryptorkidism

En följd av de endokrinstörande effekter ftalater kan ha på testiklarnas celltyper är, som tidigare nämnts, kryptorkidism. En studie där dräktiga råtthonor exponerades för mono-n-butylftalat (MBP), en metabolit till DBP, visade tydligt en ökad frekvens av kryptorkidism hos de hanliga avkommorna (Imajima *et al.*, 1997). Vid 30-40 dagars ålder var 84.6% av ungarna kryptorkida och majoriteten av dessa hade en eller båda testiklarna kvar i bukhålan. Motsvarande scenario har även visats i en annan studie några år senare där hanråttor exponerades för DBP *in utero* (Barlow & Foster, 2003). Bland annat syntes en signifikant högre förekomst av kryptorkidism samt ektopiska och atrofierade testiklar hos neonatala och unga vuxna råtthanar. Ytterligare en studie där råttor exponerades för DBP *in utero* visade på en förekomst av kryptorkidism på 100% hos de hanråttor som exponerats (Fisher *et al.*, 2003). Även andra ftalater, till exempel DEHP och BBP, har visats ge upphov till kryptorkidism hos hanråttor efter exponering *in utero* (Gray *et al.*, 2000). När det gäller andra djurslag har det till exempel visats att exponering för DBP *in utero* kan leda till kryptorkidism hos hankanin (Higuchi *et al.*, 2003).

Testiklarnas nedvandring kan delas upp i två faser (vissa författare föreslår tre), en transabdominell och en inguinoscrotal fas (Hutson *et al.*, 1997; Hutson & Hasthorpe, 2005; Amann & Veeramachani, 2007). Nedvandringen tros till stor del regleras av två hormoner producerade av de fetala Leydigcellerna där den transabdominella fasen anses delvis vara styrd av hormonet insulinlik faktor-3 och den inguinoscrotala fasen av androgen (Kawakami *et al.*, 1993; Emmen *et al.*, 2000; Hutson & Hasthorpe, 2005; Sharpe, 2006; Arrighi *et al.*, 2010). Försök har till exempel gjorts där man visat att frånvaro av insulinlik faktor-3 under fosterstadiet leder till kryptorkidism med testiklarna kvar i bukhålan hos möss (Zimmermann *et al.*, 1999). Insulinlik faktor-3 har även visats spela en viktig roll för den transabdominella fasen av testiklarnas nedvandring hos hanhund (Arrighi *et al.*, 2010). I en annan studie på hund har man visat på en markant ökning i av testosteronhalter i serum i samband med den inguinoscrotala nedvandringen av testiklarna, vilken framförallt sker post partum hos hund (Kawakami *et al.*, 1993). Förutom en antiandrogen verkan har ftalater, som till exempel DEHP och DBP, visats kunna påverka produktionen av insulinlik faktor-3 under fosterstadiet negativt hos råttor och hund (Wilson *et al.*, 2004; McKinnell *et al.*, 2005; Pathirana *et al.*, 2011). Det skulle tillsammans med den antiandrogena effekten av ftalater kunna förklara den ökade risken för kryptorkidism hos individer som blivit utsatta för ftalater under fostertiden.

Testikelneoplasier

Kryptorkidism i sig har visat sig vara associerad med en ökad risk för utveckling av testikelneoplasi (Hayes *et al.*, 1985; Møller *et al.*, 1996; Prener *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 2009). Huruvida detta beror på den onormala positionen av testikeln med påföljande förhöjd omgivningstemperatur eller om det finns gemensamma riskfaktorer för de båda tillstånden är inte helt klarlagt. Även testikelatrofi, som precis som kryptorkidism kan kopplas till ftalatexponering, har visat sig leda till en ökad risk för testikelneoplasi på människa (Møller *et al.*, 1996). En del forskare tror att vissa typer av testikelcancer (däribland seminom) hos människa kan vara en del av ett komplex av abnormaliteter i de hanliga könsorganen som har sin bakgrund i en störning av testiklarnas utveckling under fostertiden (Skakkebaek *et al.*, 1998, 2003). På senare år har detta komplex kommit att kallas testicular dysgenesis syndrome (TDS) och här innefattas, förutom testikelcancer, symptom som dålig spermakvalitet och kryptorkidism. Flertalet av dessa abnormaliteter, som till exempel kryptorkidism, är desamma som setts vid exponering för ftalater *in utero* hos andra djurslag (Fisher *et al.*, 2003;

Higuchi *et al.*, 2003; Skakkebaek *et al.*, 2003). Denna grupp av abnormaliteter, som utgör TDS på människa, har även setts hos hund (Grieco *et al.*, 2008b). Grieco *et al.* (2008) visade i sin studie där 38 hundar genomgick orkidektomi av olika anledningar, att åtta av dessa (21%) efter makroskopisk och histologisk undersökning av testiklarna uppvisade tecken på TDS. Ingen av hundarna uppvisade några tecken på missbildning av könsorganen vid klinisk undersökning innan operation. Av dessa åtta hundar, 8-16 år gamla, hade samtliga minst en testikelneoplasi och den dominerande neoplasitypen var seminom framför Leydigcelltumörer. Det är dock inte helt säkert att en parallell kan dras mellan människa och hund då epidemiologin skiljer sig åt. På människa är det framförallt yngre till medelålders män som drabbas medan det på hundsidan är framförallt äldre individer som utvecklar neoplasier (Hayes *et al.*, 1985; Skakkebaek *et al.*, 1998; Grieco *et al.*, 2008b).

Det finns studier som visar på ett direkt samband mellan exponering för ftalater och neoplasier i testiklarna. En av dessa studier där dräktiga honråttor utsattes för DBP i tio dagar visade på en förekomst hos hanliga avkommor, om dock låg, av fokal Leydigcellshyperplasi och Leydigcellsadenom i testiklarna vid tre månaders ålder (Mylchreest *et al.*, 1999). Leydigcellsadenom utvecklas, enligt författarna till denna artikel, normalt vid högre ålder och de föreslår därmed att de hyperplasier som sågs vid tre månaders ålder mycket väl skulle kunnat utvecklas till tumörer i ett senare livsskede. En annan studie som även den exponerat råttor för DBP *in utero* såg dock inte något samband mellan exponering och Leydigcellsadenom när hanråttornas testiklar utvärderades vid sex, tolv och 18 månaders ålder (Barlow *et al.*, 2004). En ökad förekomst av Leydigcellstumörer har också setts hos vuxna hanråttor som kroniskt exponerats för DEHP under sin livstid (inte *in utero*) (Voss *et al.*, 2005).

Känslighet och varaktighet

Känsligheten för antiandrogena substanser när det gäller utvecklingen av de hanliga könsorganen varierar under dräktigheten. I en studie på råttor har känsligheten visat sig vara störst mellan 15.5-19.5 dagar in i dräktigheten (Welsh *et al.*, 2008). Detta är tidigare än vad som förr ansetts då man trodde att känsligheten var som störst när maskuliniseringen hos fostret var synlig, vilket på råttor sker från ungefär dag 19 i dräktigheten. En annan studie på råttor visade att den mest känsliga perioden för utveckling av de hanliga könsorganen är mellan dag 16-18 i dräktigheten (Carruthers & Foster, 2005). I denna studie exponerades de dräktiga råttanorna för DBP under två sammanhängande dagar någon gång under intervallet dag 14-20 i dräktigheten. Efter födseln jämfördes sedan under vilka två dagar exponeringen gett upphov till flest missbildningar i de hanliga könsorganen.

Huruvida de toxiska effekterna på testiklarna är kvarstående eller inte efter avbruten exponering för ftalater är inte helt klarlagt. Till skillnad från effekter på till exempel njurar och lever, som anses vara reversibla, så verkar perinatal exponering för DEHP kunna leda till irreversibla skador på testiklarna hos hanråttor (Arcadi *et al.*, 1998). Detta verkar även gälla DBP, där man till exempel sett kvarvarande missbildningar i testiklar och bitestiklar i vuxen ålder hos hanråttor som enbart exponerats för DBP *in utero* (Barlow & Foster, 2003). En annan studie, även den på råttor, har dock visat att den toxiska påverkan av DEHP på Leydigcellerna, och således testosteronproduktionen, är reversibel efter exponering *in utero* och under digivningsperioden (Akingbemi *et al.*, 2001).

Honliga könsorgan

Toxiska effekter på det honliga reproduktionssystemet förekommer men antalet studier kring detta är betydligt färre än när det gäller det hanliga. En *in vitro*-studie på oocyter från nötkreatur har visat att MEHP fördröjer oocyternas mognadsprocess (Anas *et al.*, 2003). I denna studie drar man dock inga slutsatser kring vad detta innebär för den honliga reproduktiva förmågan. En annan studie har visat att vuxna honråttor utsatta för MEHP via DEHP kan få sänkta nivåer av östradiol och en störd ovulationscykel med exempelvis uteblivna ovulationer (Davis *et al.*, 1994a). Orsaken till den sänkta östradiolproduktionen anses i denna studie vara att granulosa-cellerna i de preovulatoriska folliklarna (vilka är ansvariga för östradiolproduktionen) är målceller för MEHP och dess toxicitet. Andra exempel på effekter är att exponering av dräktiga honråttor för enskilda ftalater eller en kombination av flera olika har visat sig leda till ökad risk för fosterdöd och abort (Howdeshell *et al.*, 2008). I denna studie visade sig DPP vara den mest potenta ftalaten när det gällde detta. Mekanismen bakom dessa effekter på dräktigheten är dock inte klarlagd.

Övrigt

Studier har visat att vissa ftalater ger upphov till en dosberoende, reversibel hepatomegali hos råttor och mus både vid korttidsexponering och vid kronisk exponering (Agarwal *et al.*, 1986; David *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2002). Det har även påvisats en högre risk för leverneoplasier hos mus och råttor utsatta för exponering med till exempel DEHP och DINP (David *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2002). Utvecklingen av neoplasier har kopplats till en dosberoende proliferation av hepatocyternas peroxisomer (involverade i metabolismen av fettsyror) och en ökning av peroxisomernas enzymatiska aktivitet. Det finns också evidens för att utvecklingen av leverneoplasier kan vändas om exponeringen avbryts. Effekterna på levern som beskrivits hos mus och råttor verkar dock inte förekomma hos alla djurarter. En studie har till exempel visat att apor inte utvecklar hepatomegali och ökad peroxisomproliferation i hepatocyterna vid exponering för DEHP och DINP (Pugh *et al.*, 2000). En annan studie har i *in vitro*-försök på hepatocyter från olika arter visat att peroxisomproliferation inte förekommer i hepatocyter från hamster, apa eller människa efter att dessa exponerats för metaboliter av DEHP och DINP (Kamendulius *et al.*, 2002).

Ett annat exempel på ftalaternas påverkan på kroppen är att man hos råttor sett en minskning i njurarnas vikt efter perinatal exponering för DEHP (Arcadi *et al.*, 1998), som dock var övergående vid lägre doser. Samma studie såg även att man histologiskt kunde se förminskade glomeruli och renala tubuli i njurarna. En annan studie har visat att råttor vid 18 månaders ålder som utsatts för DBP i höga doser *in utero* har en ökad risk att drabbas av urinsten med efterföljande urinstopp och ascenderande pyelonefrit (Barlow *et al.*, 2004). Orsaken till dessa patologier utreddes dock inte.

Även en generell toxisk påverkan på kroppen i form av viktnedgång har visats i ett flertal studier, exempelvis hos råttor exponerade för höga nivåer DEHP peroralt (Agarwal *et al.*, 1986). Här skedde viktnedgången trots bibehållen aptit. Efter avslutad exponering för DEHP återgick dock kroppsvikten till den normala förutom i grupper som exponerades för mycket höga nivåer. En annan studie på dräktiga råttor har även visat på en negativ påverkan på kroppsvikten vid exponering för DEHP (Parks *et al.*, 2000). De dräktiga honorna hade en signifikant lägre viktökning under de sista dräktighetsdagarna än kontrollhonorna. I samma studie sågs även att ungar till de DEHP-exponerade

honorna hade lägre kroppsvikt än ungar till icke exponerade. Ingen skillnad sågs dock i antal levande ungar från DEHP-exponerade honor jämfört med kontrollhonor.

Ytterligare en studie har istället för en negativ påverkan på kroppsvikten visat att exponering för ftalater kan kopplas till övervikt och fetma (Schmidt *et al.*, 2012). Här sågs nämligen att mushonor utsatta för DEHP under åtta veckor hade signifikant högre kroppsvikt än kontrollerna vid periodens slut. Under perioden sågs även att födointaget per vecka var upp till 20% högre hos de DEHP-exponerade individerna än hos kontrollmössen. Vid obduktion sågs mer visceralt fett hos de möss som utsatts för DEHP och histologiskt kunde hypertrofierade adipocyter ses. Intressant var också att möss utsatta för DEHP *in utero* också hade signifikant högre kroppsvikt än kontrollmössen, även nio veckor efter avvänjning då de inte varit exponerade för DEHP.

Exponering och risk

Hur mycket ftalater som frisätts från produkter, som exempelvis plastleksaker, beror dels på hur mycket ftalater produkten innehåller men även på faktorer som ytstruktur och plastens tjocklek (Stringer *et al.*, 2000; Bouma & Schakel, 2002). Andra faktorer som spelar in är hur produkten används (till exempel om den tuggas på) och exponeringstid.

I en brittisk studie från nittioalet där man enbart tittat på mängden ftalater i plastleksaker till barn sågs att i princip alla PVC-innehållande leksaker innehöll ftalater (Stringer *et al.*, 2000). Ftalatinnehållet uppgick i de flesta fall till mellan 10-40% av totalvikten och den vanligast förekommande ftalaten var DINP följd av DEHP. Av de leksaker som innehöll ftalater låg det lägsta sammanlagda innehållet på 0.004% och det högsta på 51%. Endast en leksak som inte bestod av PVC innehöll ftalater. I en annan studie där man också samlade in barnleksaker för att undersöka mängden ftalater tittade även på hur mycket av dessa som frisattes om leksaken lades i artificiellt framställd saliv (Bouma & Schakel, 2002). Här sågs att ftalatinnehållet för de flesta produkter låg mellan 30-45% av totalvikten och de vanligaste ftalaterna som förekom var även här DINP och DEHP. I samma studie sågs att frisättningen av DINP och DEHP ökade med ökat ftalatinnehåll och att produkter som innehöll mindre än 5% ftalater inte gav upphov till ett mätbart läckage. Det är dock inte helt enkelt att bedöma läckaget av ftalater via dessa metoder. Beroende på hur försöket utförs fås olika mängd ftalater ut (Steiner *et al.*, 1998). Enligt Steiner *et al.* (1998) ger en extraktionsmetod som är statisk (där plasten som undersöks ligger still i artificiell saliv) till exempel ett vilseledande lågt värde jämfört med dynamiska metoder (där t.ex. tugg rörelser simuleras) eller *in vivo*-studier där man mäter mängden ftalater i äkta human saliv.

En liknande studie där man tittat på läckage av ftalater till artificiell saliv har gjorts på träningsredskap för apportering ("dummies") och leksaker avsedda för hund (Wooten & Smith, 2013). Här sågs läckage av ftalater från både träningsredskap och andra hundleksaker men med störst läckage från träningsredskapen. Den dominerande ftalaten i träningsredskapen var DEHP medan DEP var den vanligaste i andra hundleksaker. Det sågs även att åldrade eller tuggade träningsredskap och vissa leksaker gav upphov till de högsta koncentrationerna av ftalater i den syntetiska saliven. Skillnader i läckage sågs också mellan olika färger och märken på leksakerna.

Danska Miljöstyrelsen har gjort en uppskattning av risken för våra sällskapsdjur, framförallt hund, att leka med ftalatinnehållande leksaker (Müller *et al.*, 2006). De har utgått ifrån det scenario att en hund biter sönder och sväljer en bit av en plastleksak och utifrån studier angående till exempel ftalatinnehåll och läckage samt framtagna gränsvärden har de dragit slutsatser om riskerna. När det gäller DEHP, som är vanlig i plastleksaker, ger ett konservativt antagande om att 10% av ftalatinnehållet läcker till magtarmkanalen kritiska exponeringsnivåer även för stora hundar som får i sig mycket små plastbitar. Det är kanske inte så troligt att en hund sväljer plastbitar dagligen vilket i så fall skulle leda till en kontinuerligt hög exponering för DEHP. Författarna hävdar dock att även ett enstaka intag kan utgöra en risk. Detta gäller framförallt dräktiga tikar då även en kortvarig exponering för ftalater *in utero* kan medföra missbildningar av fostrets reproduktionsorgan om den sker vid ”rätt” tidpunkt (Müller *et al.*, 2006; Welsh *et al.*, 2008).

Hur mycket ftalater som en individ får i sig dagligen kan uppskattas genom att mäta ftalaternas metaboliter i urinprov. Sådana studier är begränsade i antal när det gäller sällskapsdjur men ett flertal har utförts på humansidan. En tysk pilotstudie som mätte halten av metaboliterna till DBP och BBP i urin hos barn från 2-14 års ålder såg att det dagliga intaget ökade signifikant med sjunkande ålder (Koch *et al.*, 2007). Här sågs också att mellan 25-50% av barnen i åldersgruppen 2-4 år översteg det, av European Food Safety Authority (EFSA), uppsatta tillåtna dagliga intaget (TDI) av DBP på 10 µg/kg kroppsvikt/dag (EFSA, 2005; Koch *et al.*, 2007). Detta TDI är beräknat utifrån resultat i toxikologiska studier utförda på framförallt gnagare (EFSA, 2005). Motsvarande trend hos barn har setts i studie där exponering för olika ftalater hos européer i olika ålderskategorier bedömdes (Wormuth *et al.*, 2006). Där sågs att spädbarn och småbarn hade det högsta intaget av ftalater i relation till kroppsvikt för samtliga åtta ftalater som testades, inklusive ett flertal som är känt reproduktionstoxiska.

En tysk studie har tittat på intag av bland annat DBP hos vuxna män och kvinnor i åldern 20-29 år från år 1988 till 2003 (Wittassek *et al.*, 2007). Här kunde visas att det estimerade dagliga intaget av DBP hade minskat betydligt mellan år 1988 och 2003 där medianvärdet för 2003 låg mer än tre gånger lägre än det gjorde 1988 (1.9 µg/kg kroppsvikt/dag jämfört med 7 µg/kg kroppsvikt/dag). Sett över hela tidsperioden låg 14% av försökspersonerna på ett intag som översteg EFSA:s TDI för DBP varav hälften av dessa var kvinnor i barnafödande ålder. Sett på enbart 2003 var det endast en av försökspersonerna som översteg detta TDI. Generellt kunde sägas att kvinnor hade ett högre estimerat dagligt intag av ftalater än män. Enligt en studie utförd vid Lunds Universitet på Naturvårdsverkets begäran verkar även intaget av ftalater hos unga svenska män sjunka (Naturvårdsverket, 2014). I denna studie sågs en signifikant sänkning av ett flertal ftalatmetaboliter i urinen under perioden 2000-2013.

Ett TDI baseras oftast på vetenskapligt framtagna gränsvärden för den dos där icke önskvärda effekter uppkommer till följd av exponering för det aktuella ämnet, så kallad no observed adverse effect level (NOAEL) respektive lowest observed adverse effect level (LOAEL). Det TDI som EFSA tagit fram för DBP enligt ovan baserades på ett LOAEL-värde från en studie på råttor på 1500-3000 µg/kg kroppsvikt/dag (Lee *et al.*, 2004; EFSA, 2005). Då den studie där detta värde togs fram var utförd på råttor applicerades sedan en osäkerhetsfaktor på 200 för att få fram ett rimligt värde för ett annat

djurslag, i detta fall människa. På så sätt fick man då fram ett TDI för människa på 10 µg/kg kroppsvikt/dag. Andra studier har dock kommit fram till andra värden på NOAEL och LOAEL för samma ftalat vilket också ger andra estimerade värden på TDI (Mylchreest *et al.*, 2000).

I en annan studie där man har försökt komma fram till ett NOAEL-värde för DEHP har man tittat på effekter av exponering under 13 veckor på råtta (Poon *et al.*, 1997). Där fann man ett gränsvärde på 3.7 mg/kg kroppsvikt/dag för handjur och 4.2 mg/kg kroppsvikt/dag för hondjur. Det organ som påverkades vid lägst nivå av DEHP, och således fick ligga till grund för värdet på NOAEL, var testiklarna. Vad gäller påverkan på enbart levern vid exponering för DEHP (hepatomegali, ökad peroxisomproliferation och utveckling av neoplasier) ligger, enligt en annan studie, NOAEL för råtta och mus på ungefär 29-36 mg/kg kroppsvikt/dag respektive 19-24 mg/kg kroppsvikt/dag (David *et al.*, 1999). Detta kan, enligt författarna, till viss del vara vägledande när risken ska beräknas för andra djurslag.

Då ett flertal olika ftalater, och dess metaboliter, finns ubikvitärt i omgivningen exponeras kroppen för mer än en ftalat dagligen. Studier har visat att olika typer av ftalater kan ha additiva antiandrogena effekter då de tas upp av kroppen samtidigt. Till exempel har man på råtta sett att exponering för DEHP i kombination med DBP *in utero* istället för var och en för sig ger upphov till fler och kraftigare störningar i det hanliga reproduktionssystemet genom en dos-additiv effekt (Howdeshell *et al.*, 2007). Motsvarande resultat har setts vid kombination av ftalaterna BBP, DBP, DEHP, DBP och DPP (Howdeshell *et al.*, 2008). En dos-additiv effekt har också setts vid exponering för ftalater i kombination med andra kemikalier som stör utvecklingen av det hanliga reproduktionssystemet även om de inte gör det genom samma cellulära och molekylära verkningsmekanism (Rider *et al.*, 2008). Den kumulativa risken bör därför också tas i beaktande för att kunna göra en korrekt riskvärdering. Detta i sin tur borde enligt en del författare leda till ett gemensamt TDI för ftalater som grupp (Wittassek *et al.*, 2007).

PILOTSTUDIE

Introduktion

Ftalater är en grupp av kemikalier som används frekvent som mjukgörare i olika ämnen, framförallt PVC-plast (Kavlock *et al.*, 2006; Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008; KemI, 2014). De klassas som ”externa mjukgörare” vilket innebär att de lätt läcker från de produkter i vilka de ingår (Petersen & Breindahl, 2000; Heudorf *et al.*, 2007; Miljöstyrelsen, 2010; KemI, 2014). Efter läckaget kan sedan ftalaterna tas upp av kroppen antingen peroralt, transkutant, via inhalation eller via placenta *in utero* (Stroheker *et al.*, 2006; Heudorf *et al.*, 2007). Hur mycket ftalater som frisätts från en produkt beror på ett flertal faktorer som till exempel mängden ftalater i produkten, ytstruktur, exponeringstid samt på vilket sätt produkten används (Stringer *et al.*, 2000; Bouma & Schakel, 2002).

Ett flertal ftalater har visat sig ge upphov till reproduktionstoxiska effekter på olika djurslag med bland annat störd utveckling av reproduktionsorganen som följd (Agarwal *et al.*, 1986; Imajima *et al.*, 1997; Mylchreest *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000; Barlow & Foster, 2003; Fisher *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2003; Lee & Veeramachaneni, 2005; Ljungvall *et al.*, 2005; Voss *et al.*, 2005; Pathirana *et al.*, 2011; Moody *et al.*, 2013). På grund av detta har en lagstiftning införts på EU-nivå angående användning av ftalater i produkter med särskilt hårda bestämmelser gällande barnleksaker och barnavårdsartiklar vilka kan läsas i förordning (EG) nr 1907/2006. För hundleksaker finns dock ingen sådan lagstiftning i dagsläget.

De reproduktionstoxiska effekterna uppkommer till följd av en antiandrogen verkan hos ftalaterna (Davis *et al.*, 1994b; Mylchreest *et al.*, 2000). De effekter som setts på reproduktionssystemet efter exponering är exempelvis små och atrofierade testiklar och bitestiklar, förminskade accessoriska könskörtlar, kryptorkidism och testikelneoplasier (Agarwal *et al.*, 1986; Imajima *et al.*, 1997; Mylchreest *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000; Barlow & Foster, 2003; Fisher *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2003; Voss *et al.*, 2005). Även negativa effekter på spermakvalitet och fertilitet har setts (Agarwal *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2003; Ferrara *et al.*, 2006). Den största delen av forskningen på området har riktats in på effekterna på handjur men även effekter på hondjur förekommer (Davis *et al.*, 1994a, 1994b; Mylchreest *et al.*, 2000; Howdeshell *et al.*, 2008).

Trots att den största delen av de studier som utförts inom området är gjorda på gnagare så finns anledning att tro att även hund kan påverkas negativt av exponering för ftalater. Det har exempelvis setts *in vitro* att testosteronproduktionen hämmas i hundtestiklar vid exponering för ftalaterna MBP och MEHP (Pathirana *et al.*, 2011). Jämförande studier mellan hund och andra djurslag gällande metabolismen av ftalater visar också på många likheter (Ikeda *et al.*, 1980). Detta i kombination med att kliniska fynd så som kryptorkidism och testikelneoplasier förekommer relativt frekvent hos hund gör att man kan misstänka att ftalaterna kan påverka även våra hundars reproduktionssystem negativt (Kawakami *et al.*, 1984; Hayes *et al.*, 1985; Yates *et al.*, 2003; Grieco *et al.*, 2008a).

Förekomst av kryptorkidism och testikelneoplasier hos hund har studerats i ett flertal studier. En studie som undersökte förekomsten av testikelneoplasier hos hund inkluderade 232 intakta hanhundar av varierande ras och ålder som skickats in för rutinobduktion (Grieco *et al.*, 2008a). Ingen av hundarna

visade tecken på feminisering eller var kryptorkida. Här fann man att 62 (27%) av de undersökta hundarna hade någon typ av testikeltumör och samma hund hade ofta flera tumörer. Av de 110 tumörer som identifierades var 50% intersticiecellstumörer, 42% seminom och 8% Sertolicellstumörer. Cirka en tredjedel av de hundar som diagnosticerades med testikelneoplasi hade mer än en typ av neoplasi.

I en amerikansk fall-kontrollstudie från 1985 där man gått igenom journaler från sju sammanhängande år på tolv universitetsdjursjukhus tittade man på förekomst av kryptorkidism och testikelneoplasier hos hanhundar samt om någon ökad risk kunde ses för testikelneoplasi givet att hunden var kryptorkid (Hayes *et al.*, 1985). Kryptorkidism förekom i denna studie hos totalt 1.2% av de hanliga patienterna och förekomsten varierade mellan raser där högst estimerad relativ risk återfanns hos Toypudel, Pomeranian och Yorkshire terrier vilket antyder att en genetisk predisposition kan finnas hos vissa raser. Denna studie kunde dock inte visa ett signifikant samband mellan ras och kryptorkidism. Däremot kunde ett signifikant samband ses mellan storlek på ras och kryptorkidism där små raser var drabbade i högre utsträckning än stora. När det gäller estimerad relativ risk för testikelneoplasi vid kryptorkidism räknades ett värde på 9.2 ut jämfört med en kontrollpopulation vilket visar på en tydligt ökad risk. Av diagnosticerade testikelneoplasier hos kryptorkida hundar var hälften Sertolicellstumörer och en tredjedel seminom vilket skiljer sig från tidigare citerad studie på icke kryptorkida hundar (Grieco *et al.*, 2008a) där den vanligaste tumörtypen var intersticiecellstumör och den ovanligaste Sertolicellstumör. I en annan studie sågs att testikelneoplasi hos hanhundar under tio års ålder var signifikant associerade med kryptorkidism (Liao *et al.*, 2009). Ett liknande samband kunde inte ses hos hanhundar över tio års ålder.

En något högre förekomst av kryptorkidism än ovan sågs i en tidigare studie där man fann den ligga mellan 3.3-6.8% (Yates *et al.*, 2003). Denna förekomst grundade sig på fynd vid kastrering av totalt 3518 hundar under cirka tre och ett halvt års tid där 240 stycken var kryptorkida (6.8%). Drygt hälften av dessa hundar var känt kryptorkida sedan tidigare varför författarna valde att korrigera förekomsten till ett spann mellan 3.3-6.8%. En signifikant högre förekomst av kryptorkidism sågs hos rashundar jämfört med blandrashundar där vissa rashundar var överrepresenterade som till exempel Chihuahua vilket, precis som i studien av Hayes *et al.* (1985), skulle kunna antyda att det finns en genetisk faktor för tillståndet. En studie som undersökt förekomsten av kryptorkidism hos enbart blandrashundar fick istället fram en förekomst på 1.2% (29/2365) (Kawakami *et al.*, 1984).

För att få en uppfattning om förekomsten av kryptorkidism och testikelneoplasier hos hundar i Sverige har statistik från Agria granskats i samband med denna studie (Olsson, P., Agria, pers. medd., 2014-09-12). Totalt antal hundar med testikelneoplasi inrapporterade 2013 var 317 stycken. Dividerat med antal försäkrade hanhundar hos Agria (totalt 169 406) ger detta en ungefärlig förekomst på 0.2% vilket innebär att 0.2% av alla hanhundar försäkrade hos Agria diagnosticerades med testikelneoplasi under 2013. För kryptorkidism kan sägas att 89 av samtliga försäkrade hanhundar hos Agria har fått diagnosen kryptorkidism. Detta ger en procentsats på ungefär 0.05%. Dock bör siffrorna betraktas med försiktighet då gömda fall av både kryptorkidism och testikelneoplasi kan finnas med tanke på att både dessa tillstånd kan vara en indikation för rutinkastration. Utöver detta kan testikelneoplasi förekomma utan att de upptäcks vid undersökning om de är små vilket kan innebära ett stort mörkertal.

Med bakgrund av att både testikelneoplasi och kryptorkidism drabbar hund och att dessa två tillstånd kopplats till exponering för ftalater hos andra djurarter genomfördes denna pilotstudie i syfte att undersöka nivåerna av olika ftalater i hundleksaker på den svenska marknaden.

Material och metoder

Tio hundleksaker valdes ut för att skickas på analys avseende ftalater. För att få en spridning mellan olika leksakstyper och tillgång till olika utbud köptes leksakerna in från tre av de stora affärskedjorna för hundtillbehör samt från en livsmedelsbutik tillhörande en av de stora livsmedelskedjorna.

I första hand valdes leksaker som var producerade av PVC, då detta är det material i vilket ftalater förekommer i störst utsträckning enligt litteraturen, men även leksaker av annat material inkluderades. För att få spridning bland de utvalda leksakerna vägdes även kriterier som tillverkningsland, färg och lukt in. Stark lukt ansågs, dock icke vetenskapligt grundat, kunna indikera en hög förekomst av kemikalier och fick vara en vägledande parameter i de fall märkning angående material saknades.

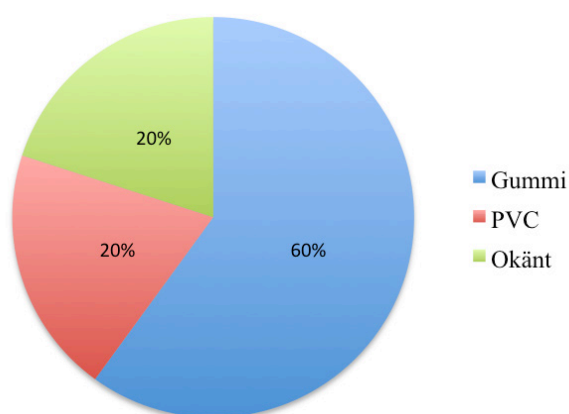
Efter inköp skickades leksakerna till ett laboratorium (ALS Scandinavia, Täby) för analys avseende tolv olika ftalater. Leksakerna fraktades paketerade i papper för att undvika kontaminering av ftalater från andra plaster som till exempel plastpåsar. ALS Scandinavia anlät sedan i sin tur ett tyskt laboratorium (GBA Laboratory Group, Pinneberg) för genomförande av analysen med gaskromatografi och masspektrometri. Det finns inga bestämmelser kring vilken metod som ska användas vid analys av ftalater i produkter. GBA Laboratory Group är ackrediterat av det tyska ackrediteringsorganet Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS) vilket försäkrar kvalitet av analysmetoden och utförandet av denna. Urvalet av de ftalater som ingick i analyspaketet innehöll bland andra de sex ftalater som enligt Reach-förordningen är förbjudna i leksaker till barn och barnavårdsartiklar.

Kontakt togs med samtliga leksakstillverkare eller importörer (i de fall inga kontaktuppgifter fanns till tillverkaren) för att försöka erhålla information om produktionsland och försäljningsvolym av de olika leksakerna i Sverige.

Resultat

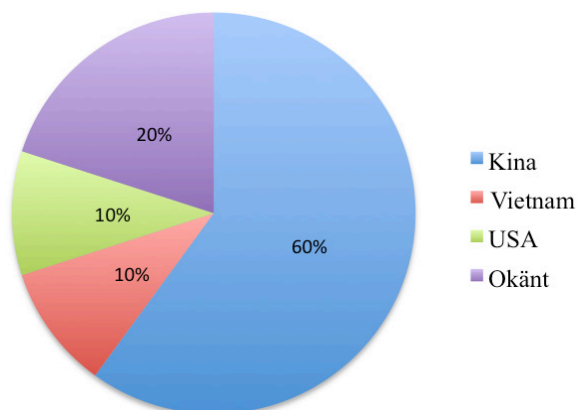
Leksakstyper

Utbudet av hundleksaker av PVC visade sig vara litet och de flesta hundleksaker på marknaden var istället producerade av gummi. Ett mindre antal leksaker saknade märkning avseende material och ett fåtal leksaker var uttryckligen producerade av PVC. Detta gjorde att strategin för urval fick omvärderas något. De leksaker som valdes ut var i första hand de som var producerade av PVC och sedan valdes leksaker utan märkning som kunde tros helt eller delvis bestå av PVC utifrån utseende och känsla av materialet. Efter detta kompletterades inköpet med leksaker i gummi som är vanliga på marknaden. En av gummileksakerna var märkt som ”producerad av giftfritt material”. För att undersöka om detta stämde avseende ftalater valdes även en sådan ut för studien. Fördelningen mellan olika material kan ses i Figur 2.



Figur 2. *Fördelning av olika tillverkningsmaterial.*

Ungefär lika många leksaker i varje färg valdes (blå, röd, grön samt gul/orange). Då få leksaker uttryckligen var producerade av PVC avgjordes valet också delvis på lukt där de leksaker som luktade kraftigast valdes. Spridning avseende produktionsland försökte också åstadkommas. Detta var dock svårt av två anledningar. Dels saknades märkning avseende produktionsland på många leksaker och av de leksaker som hade märkning var majoriteten producerade i Kina. Efter att ha lyckats komma i kontakt med de flesta leksakstillverkarna/importörerna kunde konstateras att minst sex av tio leksaker var producerade i Kina, en i USA och en i Vietnam (se Figur 3). En av tillverkarna till två av de utvalda leksakerna ville inte svara på var deras leksaker producerades.



Figur 3. *Fördelning över produktionsländer.*

Leksakerna som valdes ut kom från totalt åtta olika tillverkare. Avseende försäljningsvolym var det få tillverkare/importörer som ville dela med sig av denna information med hänvisning till sekretess. Tillverkarna till leksakerna 1R (gummi), 1O (omärkt) och 2B (PVC) delgav dock att försäljningen i Sverige uppgick till 2500-4000, 6000 respektive cirka 100 stycken per år.

Förekomst av ftalater

Resultatet som erhöles från laboratoriet visade på låga nivåer av ftalater i åtta av de hundleksaker som testades. Dock fanns undantag då två leksaker innehöll ftalatinivåer över de gränsvärden som finns uppsatta avseende leksaker för barn. De vanligast förekommande ftalaterna var DEHP och DIBP och i enstaka fall DBP. Nedan listas resultaten för respektive grupp av leksaker indelat efter materialtyp. Den fullständiga rapporten avseende testresultaten hittas i bilaga 1. Halten och fördelningen av ftalater i de olika leksakerna visas i figur 7 respektive figur 8 nedan.

PVC

Två av de undersökta leksakerna var enligt märkningen producerade av PVC. Den första av dem, ett grönt tuggben (1G, figur 4) producerad i Kina, innehöll ftalaterna DIBP, DEHP och DBP i koncentrationerna 14%, 18% respektive 0.0072% av totalvikten. Detta ger en sammanlagd procentsats av ftalater på drygt 32% av totalvikten (se figur 7). Denna leksak var den som hade högst andel ftalater av samtliga testade i denna studie.



Figur 4. Leksak 1G.



Figur 5. Leksak 2B.

Den andra leksaken som också var producerad av PVC innehöll däremot i stort sett inga ftalater alls. Denna leksak var också producerad i Kina och var utformad som ett blått tuggben (2B, figur 5). Den här leksaken innehöll bara ftalaten DEHP och i en koncentration av 0.0039% av totalvikten.

Okänt material

Två av leksakerna saknade märkning avseende material. Den ena var en orange dummi (träningsredskap för hund) (1O) producerad i Kina och den andra en röd tuggboll (3R) med okänt produktionsland. Ingen av dessa leksaker innehöll detekterbara halter av ftalater.

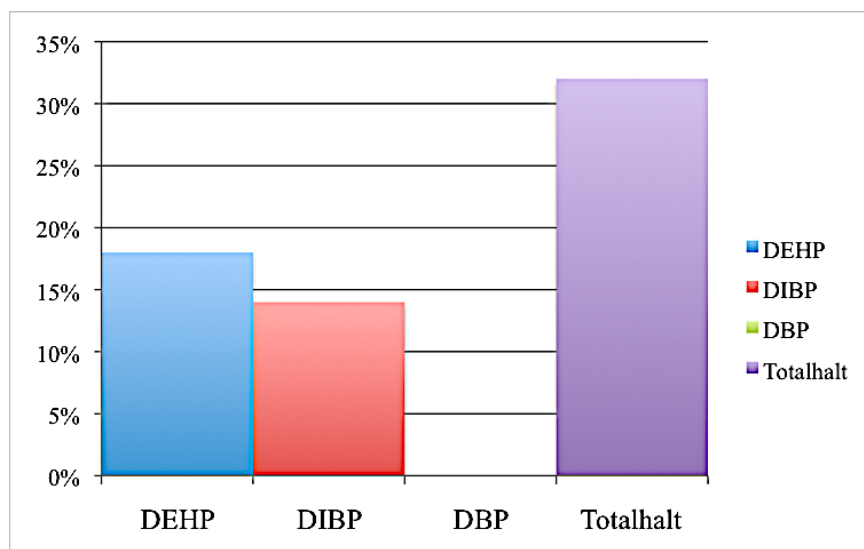
Gummi

Nedan ses ett diagram över ftalatinnehåll i de sex leksaker som enligt märkning var producerade av gummi, varav flertalet angivit naturgummi som material. De flesta av dessa innehöll mycket låga eller icke detekterbara nivåer ftalater. En av leksakerna som enligt märkningen producerats av naturgummi innehöll både ftalaterna DIBP och DEHP i koncentrationerna 0.14% respektive 0.17% av totalvikten vilket ger ett sammanlagt ftalatinnehåll på 0.31%. Leksaken var en grön tuggboll (2G) producerad i Kina.

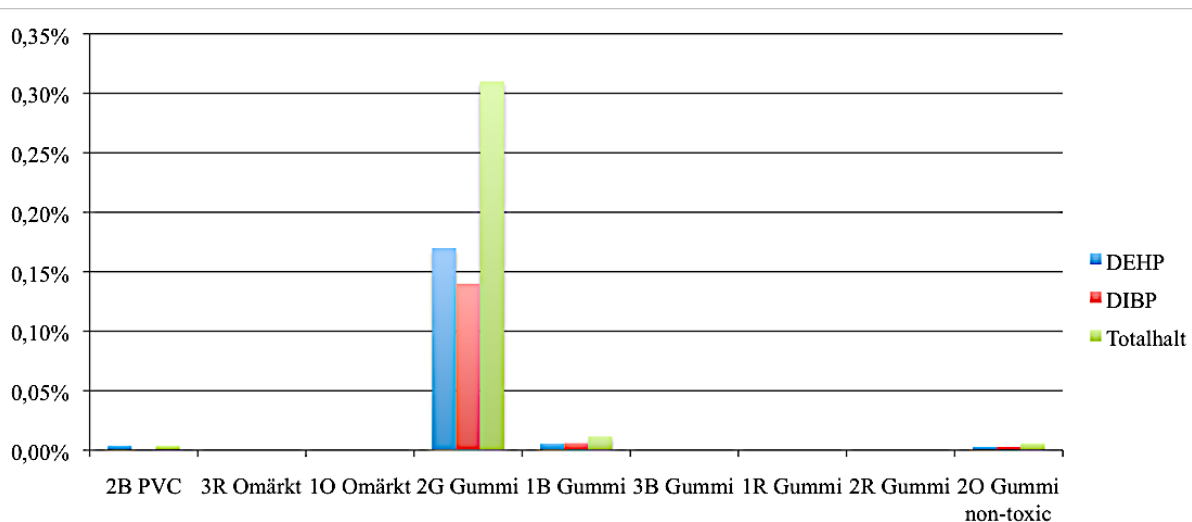
En av leksakerna som var producerade av naturgummi var på märkningen angiven som ”giftfri”. Detta var en gul tuggboll producerad i Kina (2O, figur 6). Leksaken innehöll DIBP och DEHP men i låga nivåer. Sammanlagt uppgick ftalatnivån till 0.0058% av totalvikten.



Figur 6. Leksak 2O.



Figur 7. Halten ftalater i PVC-leksaken 1G angivet i procent av totalvikten. Detta var den leksak som innehöll mest ftalater av samtliga testade.



Figur 8. Halten ftalater i samtliga leksaker förutom leksak 1G angivet i procent av totalvikten.

Diskussion

Idag finns det lagstiftning på EU-nivå kring användning av ftalater i leksaker till barn där specifika förbud och gränsvärden finns uppsatta enligt förordning (EG) nr 1907/2006. Någon sådan lagstiftning finns inte när det gäller hundleksaker trots att dessa är producerade och marknadsförda i syfte att tuggas på. En lagstiftning som förbjuder användning av vissa ftalater i produkter generellt kommer att införas 2015. Denna lagstiftning gäller dock enbart produkter producerade inom EU varför detta troligtvis inte kommer att innebära en särskilt stor förändring på marknaden för hundleksaker då de flesta av dessa är producerade utanför EU, som den här pilotstudien visar.

Den leksak (1G) som i undersökningen visade sig ha det största ftalatinnehållet (totalhalt 32% av totalvikten varav 18% DEHP) hade 180 gånger högre DEHP-koncentration än vad som är tillåtet i leksaker för barn enligt förordning (EG) nr 1907/2006. En annan ftalat som förekom i hög halt (14% av totalvikten) i samma leksak var DIBP, som under 2015 kommer att sättas upp på tillståndsförteckningen i förordning (EG) nr 1907/2006 vilket innebär att den kommer att totalförbjudas i produkter som produceras inom EU på grund av dess reproduktionstoxiska effekter. Denna leksak var en av de leksaker som var producerade av PVC vilket är det material i vilket ftalater används i störst utsträckning (Kavlock *et al.*, 2006; Committee on the Health Risks of Phthalates, 2008; KemI, 2014). Därför var det anmärkningsvärt att den andra leksaken producerad av PVC (2B) innehöll mycket låga halter ftalater. Generellt sågs även en låg förekomst av ftalater i leksaker producerade av gummi med ett undantag. En av leksakerna som enligt märkningen var producerad av naturgummi (2G) innehöll ftalater i en nivå som översteg gränsvärdet för ftalater i barnleksaker. Vad detta beror på kan enbart spekuleras kring men tänkbara orsaker är att ftalater använts trots att leksaken bestod av gummi, att leksaken kan ha varit felmärkt avseende material, att den var producerad av även andra material än naturgummi eller att leksaken kontaminerats på ytan av andra föremål. Värt att notera är också att denna leksak kom från samma producent som den PVC-leksak som innehöll höga halter DIBP och DEHP (leksaker 1G). Avseende den gummileksak som var angiven som "giftfri" (2O) bör detta uttryck anses stämma överens med verkligheten relativt väl då den innehöll DIBP och DEHP men i mycket låga nivåer (0,0058% av totalvikten). Bland de leksaker som saknade märkning om material så hittades inga höga nivåer av ftalater. Det kan därmed tänkas att

dessas troligtvis bestod av andra material än PVC. Sammanfattningsvis visar resultaten från den här pilotstudien att det i vissa hundleksaker förekommer halter av ftalater som kraftigt överstiger de gränsvärden som idag finns uppsatta för barnleksaker.

Trots att ingen lagstiftning finns gällande ftalatinnehåll i hundleksaker så verkar risken för exponering via leksaker idag ändå vara liten för hundpopulationen i stort med tanke på hur marknaden ser ut. Vid insamling av leksaker till studien besöktes ett flertal av de stora återförsäljarna av produkter för sällskapsdjur. Utbudet av leksaker producerade av PVC var mindre än väntat och vissa butiker sålde inte några sådana alls. Leksaksutbudet dominerades istället av gummi-, tyg- och latexleksaker. Om detta har att göra med att importörerna är medvetna om hälsoriskerna med ftalater i PVC-leksaker eller om det har med andra faktorer att göra, såsom hållbarhet, är svårt att uttala sig om utan vidare kontakt med importörerna. Oavsett orsaken så leder det lilla utbudet av PVC-leksaker indirekt till en låg exponeringsrisk för våra hundar sett som en hel population. Dock så visade studien att höga halter ftalater förekommer i vissa leksaker på marknaden. Även leksaker av gummi visade sig kunna innehålla ftalatinivåer över det uppsatta gränsvärdet för barnleksaker. Detta gör att det fortfarande finns risk för exponering för enskilda hundar. Intressant var också att producenten till de leksaker som innehöll mycket ftalater inte ville delge information om sina försäljningsvolymerna i Sverige vilket ytterligare gör det svårt att bedöma i hur stor utsträckning svenska hundar utsätts för dessa.

Huruvida höga nivåer av ftalater i hundleksaker innebär en hälsorisk för hundar går inte att säga säkert då det än så länge är få studier utförda på detta djurslag. Studier finns dock som visar på en liknande metabolism av ftalater hos hund och exempelvis råttor (Ikeda *et al.*, 1980). Detta gör att man i viss mån kan tänka sig att dra djurslagsövergripande slutsatser kring ftalaternas toxicitet hos de olika djurslagen. Det borde således också vara möjligt att räkna ut gränsvärdena för hund utifrån studier på råttor med samma typ av metod som gjorts för människor (Lee *et al.*, 2004). I *in vitro*-försök har man kunnat visa att både produktionen av testosteron och insulinlik faktor-3 hos hund sänks vid exponering för MEHP vilket antyder en toxisk effekt hos hund precis som hos råttor (Wilson *et al.*, 2004; Chauvigné *et al.*, 2009; Pathirana *et al.*, 2011). Vidare är det så att flera av de toxiska effekter som setts på framförallt det reproduktiva systemet hos andra djurslag efter exponering för ftalater motsvarar kliniska fynd som även förekommer hos hund. Sådana kliniska fynd är till exempel kryptorkidism och testikelneoplasi (Kawakami *et al.*, 1984; Hayes *et al.*, 1985; Yates *et al.*, 2003; Grieco *et al.*, 2008a). Med denna bakgrund går det således inte att utesluta att det kan finnas en koppling mellan exponering för ftalater och kryptorkidism och testikelneoplasi hos hund.

För att kunna uttala sig om huruvida ftalatexponering kan ha negativa effekter på reproduktionssystemet hos hund behövs idag fler studier. Det är inte helt lätt att utreda detta då många faktorer måste beaktas så som exponeringsväg, ftalatinnehåll i produkter som bits på, exponeringstid, frisättningstakt till saliven, metabolism och toxicitet hos det specifika djurslaget (Ikeda *et al.*, 1980; Gray *et al.*, 2000; Stringer *et al.*, 2000; Bouma & Schakel, 2002; Müller *et al.*, 2006; Tomonari *et al.*, 2006; Ljungvall *et al.*, 2008). För att ta reda på hur mycket hundar exponeras för ftalater skulle det till exempel vara intressant att, på liknande sätt som gjorts på människor (Koch *et al.*, 2007), fastställa halterna av olika ftalater genom urinprov. Extra intressant skulle detta vara gällande dräktiga tikar och valpar/unghundar då de toxiska effekterna av ftalater setts framförallt på djur under utvecklingsfasen av det reproduktiva systemet (Gray & Gangolli, 1986; Sjöberg *et al.*, 1986; Akingbemi *et al.*, 2001). Även klassiska toxicitetsstudier, som i stor utsträckning genomförts på gnagare, skulle vara av värde

men detta kompliceras av att det finns etiska ställningstaganden att göra vilket gör att fördelar och nackdelar med en sådan studie måste vägas noggrant mot varandra.

Den totala ftalatexponeringen för våra hundar begränsas inte till den som erhålls från tuggleksaker. Ftalater förekommer även i många andra produkter och material samt ubiquitärt i inomhusmiljön (Petersen & Breindahl, 2000; Heudorf *et al.*, 2007; Miljøstyrelsen, 2010; KemI, 2014). Exempelvis frisätts ftalater från vinylgolv och de förekommer i hushållsdamm. Hundar, som i stor utsträckning vistas på golvet, skulle därmed kunna utsättas för ftalater från dessa källor i högre grad än vi människor. Det finns även kombinationseffekter av olika ftalater och andra kemikalier som bör vägas in för att få en helhetsbild av exponeringen (Howdeshell *et al.*, 2007, 2008; Rider *et al.*, 2008).

En annan aspekt värd att ta upp i sammanhanget är risken att barn exponeras för ftalater via hundleksaker. I barnfamiljer som även har hund finns en risk att det inte enbart är hunden som leker med hundleksakerna utan även barnen. Särskilt småbarn kan stoppa hundleksaker i munnen, vilket innebär en risk för direkt ftalatexponering för barnet. En annan exponeringsväg, fastän kanske mindre omfattande, är en indirekt exponering på grund av att leksakerna kan släppa ifrån sig ftalater till omgivningen vilket gör att dessa ansamlas i hemmiljön (Heudorf *et al.*, 2007; Miljøstyrelsen, 2010; KemI, 2014). Därmed blir barnen exponerade för ftalater trots den rigorösa lagstiftning som finns kring ftalatanvändning i leksaker till barn.

Sammanfattningsvis kan sägas att då ingen lagstiftning finns gällande ftalatinnehåll i hundleksaker kan dessa, framförallt leksaker av PVC, innehålla stora mängder ftalater. Toxiska effekter på i huvudsak reproduktionssystemet har setts på ett flertal djurslag (Gray *et al.*, 2000; Anas *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2003; Lee & Veeramachaneni, 2005; Ljungvall *et al.*, 2005; Moody *et al.*, 2013) men mycket få studier finns avseende hund. Studier har dock gjorts som visar på likheter mellan hund och andra djurslag gällande exempelvis metabolism av ftalater samt histologiska och endokrinologiska avvikelser efter exponering (Ikeda *et al.*, 1980; Grieco *et al.*, 2008b; Pathirana *et al.*, 2011). Detta i kombination med att det förekommer kliniska fynd hos hund som liknar de effekter som ses vid ftalatexponering hos djurslag som råtta och kanin (Hayes *et al.*, 1985; Mylchreest *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2003; Yates *et al.*, 2003; Voss *et al.*, 2005; Grieco *et al.*, 2008a) gör att en toxisk effekt även hos hund inte kan uteslutas. Med detta som bakgrund bör en rekommendation till djurägare vara att i största möjligaste mån undvika tuggleksaker producerade av PVC. För att lyckas med det får man som djurägare försöka försäkra sig om materialet i leksaken genom att titta på eventuell märkning. Generellt kan sägas att leksaker producerade i gummi är att föredra framför de som innehåller PVC, då gummileksaker oftast inte verkar innehålla ftalater i någon större mängd. Dock finns undantag varför man inte kan vara helt säker på att slippa ftalaterna trots att man väljer leksaker producerade av gummi. Ägare till dräktiga tikar och valpar bör vara extra noggranna med vilka leksaker deras hund leker med då de toxiska effekterna är som mest påtagliga under utvecklingsfasen av reproduktionsorganen (Gray & Gangolli, 1986; Sjöberg *et al.*, 1986; Akingbemi *et al.*, 2001). Eftersom ftalatinnehållande föremål kan släppa ifrån sig ftalater till miljön (Heudorf *et al.*, 2007; Miljøstyrelsen, 2010; KemI, 2014) bör ytterligare en rekommendation vara att inte låta hundleksaker ligga framme när de inte används. Detta för att undvika onödig exponering av djur och människor i hushållet, framförallt små barn som har en tendens att stoppa föremål i munnen vilket leder till ökad exponering.

REFERENSER

- Agarwal, D.K., Eustis, S., Lamb, J.C., Reel, J.R. & Kluwe, W.M. (1986). Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environmental Health Perspectives*, 65:343–350.
- Akingbemi, B.T., Youker, R.T., Sottas, C.M., Ge, R., Katz, E., Klinefelter, G.R., Zirkin, B.R. & Hardy, M.P. (2001). Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biology of Reproduction*, 65:1252–1259.
- Albro, P.W. (1986). Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environmental Health Perspectives*, 65:293–298
- Amann, R.P. & Veeramachaneni, D.N.R. (2007). Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*, 133:541–561.
- Anas, M.-K.I., Suzuki, C., Yoshioka, K. & Iwamura, S. (2003). Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on bovine oocyte maturation in vitro. *Reproductive Toxicology*, 17:305–310.
- Arcadi, F.A., Costa, C., Imperatore, C., Marchese, A., Rapisarda, A., Salemi, M., Trimarchi, G.R. & Costa, G. (1998). Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food and Chemical Toxicology*, 36:963–970.
- Arrighi, S., Bosi, G., Groppetti, D., Aralla, M. & Cremonesi, F. (2010). An insight into testis and gubernaculum dynamics of INSL3-RXFP2 signalling during testicular descent in the dog. *Reproduction, Fertility and Development*, 22:751–760.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2002). *Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate*. Georgia: ATSDR. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp9.pdf>
- Barlow, N.J. & Foster, P.M.D. (2003). Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to Di(n-butyl) phthalate. *Toxicologic Pathology*, 31:397–410.
- Barlow, N.J., McIntyre, B.S. & Foster, P.M.D. (2004). Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicologic Pathology*, 32:79–90.

Bouma, K. & Schakel, D.J. (2002). Migration of phthalates from PVC toys into saliva simulant by dynamic extraction. *Food Additives and Contaminants*, 19:602–610.

Carruthers, C.M. & Foster, P.M.D. (2005). Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate. *Birth Defects Research (Part B)*, 74:277–285.

Chauvigné, F., Menuet, A., Lesné, L., Chagnon, M.-C., Chevrier, C., Regnier, J.-F., Angerer, J. & Jégou, B. (2009). Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 117:515–521.

Committee on the Health Risks of Phthalates (2008). *Phthalates and cumulative risk assessment*. Washington: The National Academies Press. Tillgänglig: E-brary. [2014-11-25]

David, R.M., Moore, M.R., Cifone, M.A., Finney, D.C & Guest, D. (1999). Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of Di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicological Sciences*, 50:195–205.

Davis, B.J., Weaver, R., Gaines, L.J. & Heindel, J.J. (1994a). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 128:224–228.

Davis, B.J., Maronpot, R.R. & Heindel, J.J. (1994b). Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 128:216–223.

Emmen, J.M., McLuskey, A., Adham, I.M., Engel, W., Grootegoed, J.A. & Brinkmann, A.O. (2000). Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen. *Endocrinology*, 141:4720–4727.

Europaparlamentets och rådets direktiv 2009/48/EG av den 18 juni 2009 om leksakers säkerhet.

Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG.

Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006.

European Chemicals Agency (ECHA) (2014-06-16) *Candidate List of Substances of Very High Concern for Authorisation*. <http://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table> [2014-12-02]

European Food Safety Authority (EFSA) (2005). *Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to Di-Butylphthalate (DBP) for use in food contact materials*. Parma: EFSA. (The EFSA Journal, 242: 1-17) <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/242.pdf>

Ferrara, D., Hallmark, N., Scott, H., Brown, R., McKinnell, C., Mahood, I.K. & Sharpe, R.M. (2006). Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology*, 147(11):5352–5362.

Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N. & Sharpe, R.M. (2003). Human “testicular dysgenesis syndrome”: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction*, 18:1383–1394.

Gray, T.J.B. & Gangolli, S.D. (1986). Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environmental Health Perspectives*, 65:229–235.

Gray, L.E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N. & Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological Sciences*, 58:350–365.

Grieco, V., Riccardi, E., Greppi, G.F., Teruzzi, F., Iermanò, V. & Finazzi, M. (2008a). Canine testicular tumors: a study on 232 dogs. *Journal of Comparative Pathology*. 138:86–89

Grieco, V., Riccardi, E., Veronesi, M.C., Giudice, C. & Finazzi, M. (2008b). Evidence of testicular dysgenesis syndrome in the dog. *Theriogenology*, 70:53–60.

- Hayes Jr., H.M., Wilson, G.P., Pendergrass, T.W. & Cox, V.S. (1985). Canine cryptorchidism and subsequent testicular neoplasia: Case-control study with epidemiologic update. *Teratology*, 32:51–56
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. & Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210:623–634.
- Higuchi, T.T., Palmer, J.S., Gray, L.E. & Veeramachaneni, D.N.R. (2003). Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicological Sciences*, 72:301–313.
- Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Wilson, V.S. & Gray Jr., L.E. (2007). Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicological Sciences*, 99:190–202.
- Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K. & Gray Jr., L.E. (2008). A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicological Sciences*, 105:153 – 165.
- Hutson, J.M. & Hasthorpe, S. (2005). Abnormalities of testicular descent. *Cell and Tissue Research*, 322:155–158.
- Hutson, J.M., Hasthorpe, S. & Heyns, C.F. (1997). Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, 18:259–280.
- Ikeda, G.J., Sapienza, P.P., Couvillion, J.L. & Farber, T.M. (1980). Comparative distribution, excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats, dogs and miniature pigs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18:637–642.
- Imajima, T., Shono, T., Zakaria, O. & Suita, S. (1997). Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 32:18–21.
- Ito, Y., Yokota, H., Wang, R., Yamanoshita, O., Ichihara, G., Wang, H., Kurata, Y., Takagi, K. & Nakajima, T. (2005). Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Archives of Toxicology*, 79:147–154.

- Jones, H.B., Garside, D.A., Liu, R. & Roberts, J.C. (1993). The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in vitro and in vivo. *Experimental and Molecular Pathology*, 58:179–193.
- Kamendulius, L.M., Isenberg, J.S., Smith, J.H., Pugh Jr, G., Lington, A.W. & Klaunig, J.E. Comparative effects of phthalate monoesters on gap junctional intercellular communication and peroxisome proliferation in rodent and primate hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65:569–588.
- Kaufmann, W., Deckardt, K., McKee, R.H., Butala, J.H. & Bahnemann, R. (2002). Tumor induction in mouse liver: di-isononyl phthalate acts via peroxisome proliferation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36:175–183.
- Kavlock, R., Barr, D., Boekelheide, K., Breslin, W., Breyse, P., Chapin, R., Gaido, K., Hodgson, E., Marcus, M., Shea, K. & Williams, P. (2006). NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, 22:291–399.
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P. & Zacharewski, T. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-octyl phthalate. *Reproductive Toxicology*, 16:721–734.
- Kawakami, E., Tsutsui, T., Yamada, Y. & Yamauchi, M. (1984). Cryptorchidism in the dog: occurrence of cryptorchidism and semen quality in the cryptorchid dog. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 46:303–308.
- Kawakami, E., Yamada, Y., Tsutsui, T., Ogasa, A. & Yamauchi, M. (1993). Changes in plasma androgen levels and testicular histology with descent of the testis in the dog. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55:931–935.
- Kemikalieinspektionen (Kemi) (2014). *Kartläggning av ftalater i varor i Sverige*. Stockholm: Kemikalieinspektionen. <http://kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/PM/PM-2-14-ftalater.pdf?epslanguage=sv>
- Kessler, W., Numtip, W., Grote, K., Csanády, G.A., Chahoud, I. & Filser, J.G. (2004). Blood burden of di(2-ethylhexyl) phthalate and its primary metabolite mono(2-ethylhexyl) phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195:142–153.

- Koch, H.M., Becker, K., Wittassek, M., Seiwert, M., Angerer, J. & Kolossa-Gehring, M. (2007). Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate - urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 17:378–387.
- Koch, H.M., Preuss, R. & Angerer, J. (2006). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results. *International Journal of Andrology*, 29:155–165; discussion 181–185.
- Kurata, Y., Makinodan, F., Shimamura, N. & Katoh, M. (2012). Metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): comparative study in juvenile and fetal marmosets and rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 37:33–49.
- Lee, K.Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Uneyama, C. & Hirose, M. (2004). Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*, 203:221–238.
- Lee, S.K. & Veeramachaneni, D.N.R. (2005). Subchronic exposure to low concentrations of di-n-butyl phthalate disrupts spermatogenesis in *Xenopus laevis* frogs. *Toxicological Sciences*, 84:394–407.
- Li, L.H., Jester, W.F. & Orth, J.M. (1998). Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 153:258–265.
- Liao, A.T., Chu, P., Yeh, L., Lin, C. & Liu, C. (2009). A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*. 71:919–923.
- Ljungvall, K., Karlsson, P., Hultén, F., Madej, A., Norrgren, L., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H. & Magnusson, U. (2005). Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular morphology by intramuscular low-dose di(2-ethylhexyl)phthalate or oestradiol benzoate in the prepubertal boar. *Theriogenology*, 64:1170–1184.
- Ljungvall, K., Tienpont, B., David, F., Magnusson, U. & Törneke, K. (2004). Kinetics of orally administered di(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite, mono(2-ethylhexyl) phthalate, in male pigs. *Archives of Toxicology*, 78:384–389.

- Ljungvall, K., Veeramachaneni, D.N.R., Hou, M., Hultén, F. & Magnusson, U. (2008). Morphology and morphometry of the reproductive organs in prepubertal and postpubertal male pigs exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate before puberty: Precocious development of bulbourethral glands. *Theriogenology*, 70:984–991.
- McKinnell, C., Sharpe, R.M., Mahood, K., Hallmark, N., Scott, H., Ivell, R., Staub, C., Jégou, B., Haag, F., Koch-Nolte, F. & Hartung, S. (2005). Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to di (n-Butyl) phthalate. *Endocrinology*, 146:4536–4544.
- Miljøstyrelsen (2010). *Identification and assessment of alternatives to selected phthalates*. København: Miljøstyrelsen. <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2010/978-87-92708-00-7/pdf/978-87-92708-01-4.pdf>
- Miljøstyrelsen (2013). *Business guidance on phthalates – how to limit phthalates of concern in articles?* København: Miljøstyrelsen. http://mst.dk/media/mst/9070328/branchevejledningftalater_uk_13122013.pdf
- Moody, S., Goh, H., Bielanowicz, A., Rippon, P., Loveland, K.L. & Itman, C. (2013). Prepubertal mouse testis growth and maturation and androgen production are acutely sensitive to di-n-butyl phthalate. *Endocrinology*, 154(9):3460–3475
- Moore, R.W., Rudy, T.A., Lin, T.M., Ko, K. & Peterson, R.E. (2001). Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental Health Perspectives*, 109(3):229–237.
- Müller, A.K., Nielsen, E., Ladefoged, O., Dalgaard, M. & Hass, U. (2006) *Evaluation of the health risks to animals playing with phthalate containing toys*. København: Miljøstyrelsen. (Survey of Chemical Substances in Consumer Products, No. 74, 2006)
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C. & Foster, P.M. (1999). Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156:81–95.

- Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C. & Foster, P.M. (2000). Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicological Sciences*, 55:143–151.
- Møller, H., Prener, A. & Skakkebaek, N.E. (1996). Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes and Control*, 7:264–274.
- National Toxicology Program (NTP) (2003). *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di-n-Butyl Phthalate (DBP)*. North Carolina: National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services.
- Naturvårdsverket (2014). *Gifter & miljö 2014 – om påverkan på yttre miljö och människor*. Stockholm: Naturvårdsverket.
<http://www.naturvardsverket.se/Nerladdningssida/?fileType=pdf&pid=13811&downloadUrl=/Documents/publikationer6400/978-91-620-6623-9.pdf>
- Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J. & Gray, L.E. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological Sciences*, 58:339–349.
- Pathirana, I.N., Kawate, N., Tsuji, M., Takahashi, M., Hatoya, S., Inaba, T. & Tamada, H. (2011). In vitro effects of estradiol-17 β , monobutyl phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on the secretion of testosterone and insulin-like peptide 3 by interstitial cells of scrotal and retained testes in dogs. *Theriogenology*, 76:1227–1233.
- Petersen, J.H. & Breindahl, T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Additives and Contaminants*, 17:133–141.
- Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R., Valli, V.E., Procter, B.G. & Chu, I. (1997). Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 35:225–239.
- Prener, A., Engholm, G. & Jensen, O.M. (1996). Genital anomalies and risk for testicular cancer in Danish men. *Epidemiology*, 7:14–19.

- Pugh, G., Isenberg, J.S., Kamendulis, L.M., Ackley, D.C., Clare, L.J., Brown, R., Lington, A.W., Smith, J.H. & Klaunig, J.E. (2000). Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences*, 56:181–188.
- Rider, C.V., Furr, J., Wilson, V.S. & Gray Jr., L.E. (2008). A mixture of seven antiandrogens induces reproductive malformations in rats. *International Journal of Andrology*, 31:249–262.
- Schmidt, J., Schaedlich, K., Fiandanese, N., Pocar, P. & Fischer, B. (2012). Effects of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on female fertility and adipogenesis in C3H/N mice. *Environmental Health Perspectives*, 120:1123–1129.
- Sharpe, R.M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20:91–110.
- Sjöberg, P., Lindqvist, N.G. & Plöen, L. (1986). Age-dependent response of the rat testes to Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental Health Perspectives*, 65:237–242.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Carlsen, E., Petersen, P.M., Giwercman, A., Andersen, A.G., Jensen, T.K., Andersson, A.M. & Müller, J. (1998). Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS*, 106:3–11; discussion 12.
- Skakkebaek, N.E., Holm, M., Hoei-Hansen, C., Jørgensen, N. & Rajpert-de Meyts, E. (2003). Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: Evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. *APMIS*, 111:1–11.
- Steiner, I., Scharf, L., Fiala, F. & Washüttl, J. (1998). Migration of di-(2-ethylhexyl) phthalate from PVC child articles into saliva and saliva simulant. *Food Additives and Contaminants*, 15:812–817.
- Stringer, R., Labunska, I., Santillo, D., Johnston, P., Siddorn, J. & Stephenson, A. (2000). Concentrations of phthalate esters and identification of other additives in PVC children's toys. *Environmental Science and Pollution Research*, 7:27–36.
- Stroheker, T., Cabaton, N., Nourdin, G., Régnier, J.-F., Lhuguenot, J.-C. & Chagnon, M.-C. (2005). Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology*, 208:115–121.
- Stroheker, T., Regnier, J.-F., Lassarguere, J. & Chagnon, M.-C. (2006). Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in

culture. *Food and Chemical Toxicology*, 44:2064–2069.

Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S. & Teague, J.L. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspective*, 113:1056–1061.

Tomonari, Y., Kurata, Y., David, R.M., Gans, G., Kawasuso, T. & Katoh, M. (2006). Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets: I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69:1651–1672.

Voss, C., Zerban, H., Bannasch, P. & Berger, M.R. (2005). Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 206:359–371.

Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fiskens, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B. & Sharpe, R.M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *The Journal of Clinical Investigation*, 118:1479–1490.

Wilson, V.S., Lambright, C., Furr, J., Ostby, J., Wood, C., Held, G. & Gray, L.E. (2004). Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *insl3* gene expression in the fetal rat testis. *Toxicology Letters*, 146:207–215.

Wittassek, M., Wiesmüller, G.A., Koch, H.M., Eckard, R., Dobler, L., Müller, J., Angerer, J. & Schlüter, C. (2007). Internal phthalate exposure over the last two decades - a retrospective human biomonitoring study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210:319–333.

Wooten, K.J. & Smith, P.N. (2013). Canine toys and training devices as sources of exposure to phthalates and bisphenol A: Quantitation of chemicals in leachate and in vitro screening for endocrine activity. *Chemosphere*, 93:2245–2253.

Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M. & Hungerbühler, K. (2006). What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Analysis*, 26:803–824.

Yates, D., Hayes, G., Heffernan, M. & Beynon, R. (2003). Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Veterinary Record*, 152:502–504.

Zimmermann, S., Steding, G., Emmen, J.M., Brinkmann, A.O., Nayernia, K., Holstein, A.F., Engel, W. & Adham, I.M. (1999). Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular Endocrinology*, 13:681–691.

BILAGA 1

Rapport

Sida 1 (5)

T1415590

B7FDPSGEB5



Registrerad 2014-09-08 15:31
Utfärdad 2014-09-22

SLU
Ulf Magnusson
Department of Clinical science
Box 7054
750 07 Uppsala
Sweden

Projekt
Bestnr 715UMN

Analys av material

Er beteckning	1G					
Labnummer	O10613688					
Parameter	Resultat	Osäkerhet (±)	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
dietylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfthalat	140000	21000	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfthalat	72	11	mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fthalat	180000	27000	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfthalat	<100		mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfthalat	<100		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfthalat	<100		mg/kg	1	1	INRO

Er beteckning	2G					
Labnummer	O10613689					
Parameter	Resultat	Osäkerhet (±)	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
dietylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfthalat	1400	210	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fthalat	1700	250	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfthalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfthalat	<100		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfthalat	<100		mg/kg	1	1	INRO

ALS Scandinavia AB
Box 511
183 25 Täby
Sweden

Webb: www.alsglobal.se
E-post: info.ta@alsglobal.com
Tel: + 46 8 52 77 5200
Fax: + 46 8 768 3423

Dokumentet är godkänt och digitalt
signerat av

Rapport

T1415590

Sida 2 (5)

B7FDPSGEBS



Er beteckning	1B					
Labnummer	O10613690					
Parameter	Resultat	Osäkerhet (±)	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
dietylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfталат	60	8.9	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fталат	56	8.3	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfталат	<100		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfталат	<100		mg/kg	1	1	INRO

Er beteckning	2B					
Labnummer	O10613691					
Parameter	Resultat	Osäkerhet (±)	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
dietylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fталат	39	5.8	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfталат	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfталат	<100		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfталат	<100		mg/kg	1	1	INRO

Er beteckning	3B				
Labnummer	O10613692				
Parameter	Resultat	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
dietylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
butylbensyffталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexyffталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktyffталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decyffталат	<100	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonyffталат	<100	ma/ka	1	1	INRO

ALS Scandinavia AB
Box 511
183 25 Täby
Sweden

Webb: www.alsglobal.se
E-post: info.ta@alsglobal.com
Tel: + 46 8 52 77 5200
Fax: + 46 8 768 3423

Dokumentet är godkänt och digitalt
signerat av

Rapport

T1415590

Sida 3 (5)

B7FDPSGEBS



Er beteckning	1R				
Labnummer	Q10613693				
Parameter	Resultat	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
dietylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfталат	<100	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfталат	<100	mg/kg	1	1	INRO

Er beteckning	2R				
Labnummer	Q10613694				
Parameter	Resultat	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
dietylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfталат	<100	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfталат	<100	mg/kg	1	1	INRO

Er beteckning	3R				
Labnummer	Q10613695				
Parameter	Resultat	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
dietylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfталат	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfталат	<100	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfталат	<100	mg/kg	1	1	INRO

Rapport

T1415590

Sida 4 (5)

B7FDPSGEBS



Er beteckning	10				
Labnummer	O10613696				
Parameter	Resultat	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
dietylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfitalat	<10	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfitalat	<100	mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfitalat	<100	mg/kg	1	1	INRO

Er beteckning	20					
Labnummer	O10613697					
Parameter	Resultat	Osäkerhet (±)	Enhet	Metod	Utf	Sign
dimetylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
dietylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-propylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-butylfitalat	29	4.3	mg/kg	1	1	INRO
di-n-butylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-pentylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
butylbensylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-(2-etylhexyl)fitalat	29	4.3	mg/kg	1	1	INRO
di-cyklohexylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-n-oktylfitalat	<10		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-decylfitalat	<100		mg/kg	1	1	INRO
di-iso-nonylfitalat	<100		mg/kg	1	1	INRO

Rapport

Sida 5 (5)

T1415590

B7FDPSGEBS



* efter parameternamn indikerar icke ackrediterad analys.

	Metod
1	Paket OL-4. Bestämning av ftalater enligt E DIN 19742 (2012-04). Mätning utförs med GC-MS. Rev 2014-06-04

	Godkännare
INRO	Ingalill Rosén

	Utt ¹
1	För mätningen svarar GBA, Flensburger Straße 15, 25421 Pinneberg, Tyskland, som är av det tyska ackrediteringsorganet DAkkS ackrediterat laboratorium (Reg.nr. D-PL-14170-01-00). DAkkS är signatär till ett MLA inom EA, samma MLA som SWEDAC är signatär till. Laboratorierna finns lokaliserade på följande adresser: Flensburger Straße 15, 25421 Pinneberg, Daimlerring 37, 31135 Hildesheim, Brekelbaumstraße 1, 31789 Hameln, Wiedehopfstraße 30, 45892 Gelsenkirchen, Meißner Ring 3, 09599 Freiberg, Goldtschmidtstraße 5, 21073 Hamburg. Kontakta ALS Täby för ytterligare information.

Mätosäkerheten anges som en utvidgad osäkerhet (enligt definitionen i "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", ISO, Geneva, Switzerland 1993) beräknad med täckningsfaktor lika med 2 vilket ger en konfidenznivå på ungefär 95%.

Mätosäkerhet från underleverantör anges oftast som en utvidgad osäkerhet beräknad med täckningsfaktor 2. För ytterligare information kontakta laboratoriet.

Denna rapport får endast återges i sin helhet, om inte utfärdande laboratorium i förväg skriftligen godkänt annat. Resultaten gäller endast det identifierade, mottagna och provade materialet.

Beträffande laboratoriets ansvar i samband med uppdrag, se aktuell produktkatalog eller vår webbplats www.alsglobal.se

Den digitalt signerade PDF-filen representerar originalrapporten. Alla utskrifter från denna är att betrakta som kopior.

¹ Utförande teknisk enhet (inom ALS Scandinavia) eller anlitat laboratorium (underleverantör).